

Molekulare Mechanismen der Leberregeneration nach Pfortaderembolisation

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Janina Ullmann
geboren am 16.07.1985 in Aachen

Gutachter

1. Prof. Dr. med. habil. Utz Settmacher, Jena
2. PD Dr. rer. nat. med. habil. Ralf Alexander Claus, Jena
3. Prof. Dr. med. Dr. h.c. Hans Lippert, Magdeburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.11.2011

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Abkürzungsverzeichnis	1
2 Zusammenfassung	4
3 Einleitung	6
3.1 Ätiologie und Inzidenz	6
3.2 Die Bedeutung der PAE in der modernen Leberchirurgie	7
3.3 Geschichte der PAE	8
3.4 Das Prinzip der PAE	9
3.5 Indikationen für eine PAE	10
3.6 Techniken der PAE	11
3.7 Risiken der PAE	15
3.8 Biochemische und molekulargenetische Veränderungen nach PAE	15
4. Ziele der Arbeit	17
5. Material und Methoden	18
5.1 Probenentnahme	18
5.2 Materialien und Lösungen	18
5.2.1 Materialien für die Real-Time-quantitativen-PCR	18
5.2.2 Materialien und Lösungen für die Immunfluoreszenz	18
5.3 Geräte und Software	20
5.3.1 Geräte und Software für die Real-Time-quantitativen-PCR	20
5.3.2 Geräte und Software für die Immunfluoreszenz	20
5.4 Real-Time-quantitative-PCR	21
5.4.1 Primer für die Real-Time-quantitative-PCR	21
5.4.2 Datenbanken	21
5.4.3 RNA-Isolation und Bead Array-Technologie	22
5.4.4 Statistische und bioinformatische Analysen der Bead-Array Technologie	
5.4.5 Quantifizierung der RNA	23
5.4.6 cDNA-Synthese	24
5.4.7 Primeretablierung	25
5.4.8 Bestimmung der Genregulation mittels Real-Time-quantitative-PCR	26

5.4.9 Auswertung der Real-time PCR	27
5.5 Immunfluoreszenz	28
5.5.1 Verwendete Antikörper	28
5.5.2 Methode der Probenbearbeitung im Rahmen der Immunfluoreszenz	29
5.6 Statistik	32
6 Ergebnisse	33
6.1 Real-Time-quantitative-PCR	33
6.1.1 Activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 2 (AHSA2)	36
6.1.2 ATPase, H ⁺ transporting V0 subunit e2 (ATP6V0E2)	37
6.1.3 Enolase 3 (ENO3)	38
6.1.4 Elektron-transfer-flavoprotein beta polypeptide (ETFB)	39
6.1.5 Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase (HADH)	40
6.1.6 Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)	41
6.1.7 Interleukin 1, beta (IL1B)	42
6.1.8 Proteasome activator subunit 2 (PSME2)	43
6.2 Immunhistochemie	44
6.2.1 Qualitative immunhistochemische Ergebnisse	44
6.2.1.1 Expression von beta-catenin im embolisierten und nicht embolisierten Leberproben	44
6.2.1.2 Expression von c-Jun im embolisierten und nicht embolisierten Leberproben	45
7 Diskussion	46
7.1 Objektive Wertung der Methodik	46
7.2 Diskussion der Ergebnisse	47
7.2.1 Die Rolle von beta-catenin und c-jun auf die Regeneration der Leber	47
7.2.2 Die Rolle des Insulin like growth factor Bindungsprotein 2 im Rahmen der Leberregeneration	48
7.2.3 Erstellen eines Modells	49

7.2.4 Die Veränderungen der metabolischen Mechanismen nach Pfortaderembolisation	52
7.2.4.1 Unterschiede im Expressionsmuster von Enolase 3	52
7.2.4.2 Veränderungen der Expression von dem Elektronen-Transfer-Flavoprotein	52
7.2.4.3 Unterschiede des Expressionsmusters von der Hydroxy-Coenzyme A Dehydrogenase	53
7.2.5 Immunmodulatorische Prozesse nach Pfortaderembolisation	54
7.2.5.1 Immunmodulatorische Prozesse des Interleukin 1beta	54
7.2.5.2 Expressionsunterschied des Proteasome activator subunit 2	55
7.2.6 Veränderungen in den Zellkompartimenten im Rahmen der Leberregeneration	56
7.2.6.1 Rolle des Activator of heat shock 2 im Rahmen der Leberregeneration	56
7.2.6.2 Expressionsunterschied der ATPase, H ⁺ transporting V0 subunit e2	57
8 Schlussfolgerung	59
9 Literaturverzeichnis	61
10. Anhang	66
10.1 Lebenslauf	67
10.2 Danksagung	68
10.3 Ehrenwörtliche Erklärung	69

1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADCY3	Adenylat cyclase 3
AHSA2	Activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 2
AIFM1	Apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 1
AP1	Activator protein 1
ATP	Adenintriphosphat
ATP6V0E2	ATPase, H ⁺ transporting V0 subunit e2
BCL-2	B-cell lymphoma 2
CASP8	Caspase 8
cDNA	copy DNA
c-fos	FBJ osteosarcoma oncogene
c-jun	Jun oncogene
cm	Zentimeter
c-myc	Myelocytomatose-Onkogen
COX15	COX15 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein
CT	Computertomographie
Cy3	Cyaninfarbstoff 3
Cy5	Cyaninfarbstoff 5
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated discovery
DENND2A	DENN/MADD domain containing 2A
Dest.	Destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDN1	Endothelin 1
EDNRA	Endothelin receptor type A
EDTA	Ethylen-Diamid-Tetra-Acetat
EGF	Epidermal growth factor
EGR1	Early growth response 1
ELK	E-26 like protein
ELMO1	Engulfment and cell motility 1
ENO3	Enolase 3
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
ETFB	Elektron-transfer-flavoprotein beta polypeptide
FRLV-	funktionelle Restlebensvolumen
g	Gramm
GALC	Galactosylceramidase
Gallenblase-Ca	Gallenblasenkarzinom
Gamma-GT	gamma Glutamyl-Transferase
G2-Phase	Gap Phase
HADH	Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HGF	hepatocyte growth factor
HMGB1	High-Mobility-Group-Protein B1
HPRT1	Hypoxanthin phosphoribosyltransferase 1
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1 (CD54)
IGF1/2	Insulin like growth factor 1/2
IGFBP1	Insulin-like growth factor binding protein 1
IGFBP2	Insulin-like growth factor binding protein 1
IgM	Immunglobulin M

IgG	Immunglobulin G
IKK-NF-(Kappa)	IkappaB kinase-Nuclear factor kappa B
IL1B	Interleukin 1, beta
IL 6	Interleukin 6
IL8	Interleukin 8
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
MIAME	Minimum Information About a Microarray Experiment
MHC1	Major Histocompatibility Complex 1
Min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mmol	Millimol
M-Phase	Mitose Phase
mRNA	messenger RNA
ng	Nano-Gramm
NIDDM	nicht insulinabhängiger Diabetes
nm	Nano-Meter
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
NOTCH4	Notch homolog 4
PAE-	Pfortaderembolisation
PBS	Phosphat-buffered saline
PDGF	Platelet derived growth factor
pg	Pikogramm
PLCB1	Phospholipase C, beta 1
pmol	Pikomol
PSME2	Proteasome activator subunit 2
PTCD	Perkutane transhepatische Cholangiographie
PUM1	Pumilio homolog 1
PVE	portal vein embolization
p21	Protein 21
p38	Protein 38
p53	Protein 53
RHOB	Ras homolog gene family, member B
RNA	Ribonukleinsäure
RTq-PCR	Real-Time-quantitativ-PCR
sec	Sekunden
SOCS	suppressor of cytokine signalling
SRF	Serum response factor
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
Tab.	Tabelle
TGF beta	Transforming growth factor beta
TGF alpha	Transforming growth factor alpha
TGFBR2	Transforming growth factor, beta receptor 2
TGFBR3	Transforming growth factor, beta receptor 3
THBS1	Thrombospondin 1
TLV	totale Lebervolumen

TNF alpha	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
totRNA	totale RNA
U	Umdrehung
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A
WNT5B	Wingless-type MMTV integration site family, member 5B
Wnt-Signalweg	Wingless- Int. Signalweg

2 Zusammenfassung

Hintergrund Bei zentralen Lebertumoren besteht der einzige kurative Therapieansatz in einer radikalen operativen Resektion. Entscheidend, ob eine sichere Entfernung der Tumoren durchgeführt werden kann, ist hierbei u.a. das nach der Resektion verbleibende Parenchym. Dieses kann vor allem bei der erweiterten rechtsseitigen Hemihepatektomie unterschritten werden. Somit besteht in diesen Fällen ein deutlich erhöhtes Risiko einer postoperativen Leberinsuffizienz. Die präoperative Pfortaderembolisation des später zu resezierenden Lebergewebes hat sich als geeignetes Hilfsmittel zur Induktion einer Hypertrophie des kontralateralen Leberlappens erwiesen. Jedoch sind die genauen molekularen Mechanismen dieser Leberregeneration noch zu großen Teilen ungeklärt.

Fragestellung Vor diesem Hintergrund sollte die Frage bearbeitet werden, in welchem Maße Unterschiede im Genexpressionsmuster vor Embolisation, aus dem nicht embolisierten Leberlappen und aus dem embolisierten Leberlappen bestehen. Zunächst erfolgte eine pangenomische Genexpressionsanalyse. Anschließend wurden in einer hypothesengenerierenden Vorgehensweise Kandidatengene ausgewählt, die wiederum im Rahmen der Real-Time-quantitative-PCR und mittels Immunfluoreszenz genauer untersucht wurden.

Methodik Zehn Patienten mit einem zentralen Lebertumor, welche zur Konditionierung einer Trisektorektomie rechts eine Pfortaderembolisation benötigten, wurden in die Studie eingeschlossen. Vor der perkutanen Embolisation der rechten Pfortader wurde eine Leberbiopsie aus tumorfreiem Lebergewebe entnommen. 40 Tage (34-55 Tage) nach erfolgter Pfortaderembolisation wurden die Patienten hinsichtlich einer möglichen Resektabilität des Malignoms exploriert. Intraoperativ wurde sowohl aus dem embolisierten als auch dem nicht-embolisierten Leberlappen jeweils eine Keilbiopsie entnommen, welche nachfolgend kryokonserviert und molekularbiologisch untersucht wurde.

Es wurde die Expression von 29 Genen, welche anhand der Microarray-Daten ausgewählt wurden, mit dem Verfahren der RTq-PCR ermittelt. Weiterhin wurden die Transkripte zweier Gene im Rahmen der Immunfluoreszenz untersucht.

Ergebnisse und Diskussion Die Analyse der drei Proben mit Hilfe der RTq-PCR zeigte bei 8 Genen, welche maßgeblich an der Leberregeneration beteiligt sind, signifikante Unterschiede

im Transkriptionsmuster zwischen dem embolisierten und dem nicht embolisierten Leberlappen. Die Proteine vermitteln in verschiedenen Zellkompartimenten durch unterschiedliche Funktionen und Stoffwechselprozesse die Regeneration, Proliferation und Hypertrophie des Lebergewebes.

Im Rahmen der Immunfluoreszenz konnte ein klarer Unterschied der Gene beta-catenin und c-jun zwischen dem embolisierten Leberlappen und dem nicht embolisierten Leberlappen gezeigt werden.

Beide Gene vermögen eine wichtige Rolle in der Leberentwicklung, Proliferation und Regeneration einzunehmen. Sowohl beta-catenin als auch c-jun vermitteln über den AP1- und HMGB1-Signalweg regenerative Effekte in humanem Lebergewebe.

Schlussfolgerung Die Ergebnisse dieser Arbeit ermöglichen neue Einblicke in die molekularen Prozesse der Regeneration der Leber nach PAE. Aufgrund der Untersuchungen der vorliegenden Studie konnten einige mögliche Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen mit einer potentiellen pharmakologischen Stimulation der an der Leberregeneration beteiligten Proteine aufgezeigt werden

3 Einleitung

Die Resektion von Lebertumoren stellt derzeit den Goldstandard in der kurativen Behandlung von Patienten mit primären und sekundären Lebermalignomen dar. Besonders bei proximalen Cholangiokarzinomen (Klaskin-Tumor), dem Gallenblasen-Karzinom oder anderen zentralen Lebertumoren, sowohl primär als auch sekundär, muss eine erweiterte Hemihepatektomie vorgenommen werden, um tumorfreie Resektionsränder zu erzielen. Die erweiterte Hemihepatektomie geht häufig mit einem deutlichen Verlust an funktionellem Lebergewebe einher, welcher einen Risikofaktor für die Entstehung einer postoperativen Leberinsuffizienz darstellt. Postoperatives Leberversagen nach Leberresektionen ist noch immer ein Hauptgrund für das Versterben der Patienten in der frühen postoperativen Phase (Abulkhir et al. 2008).

3.1 Ätiologie und Inzidenz

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) gehört weltweit zu den 10 häufigsten bösartigen Tumoren. In jedem Jahr erkranken über eine Million Menschen am HCC und in einigen Ländern, wie z.B. in China, Taiwan oder in Hongkong, ist das HCC die häufigste tumorbedingte Todesursache (Bosch 2005). In Europa und den USA beträgt die Inzidenz des HCC 5/100000 jährlich, m:w= 3:1. Der Altersgipfel des HCC liegt im 5.-6. Lebensjahrzehnt (Herold 2008).

Das HCC ist eine der häufigsten Komplikationen der Leberzirrhose. Pro Jahr wird in ca. 4 % der zirrhotischen Lebern ein HCC gefunden (Herold 2008).

Die Inzidenz des zentralen proximalen Cholangiokarzinoms liegt bei 3/100000 jährlich (Herold 2008). Die Prädispositionsstelle dieses Adenokarzinoms ist der Zusammenfluss des rechten und linken Ductus hepaticus (Klatskin II-IV). In der folgende Tabelle wird noch einmal die Klaskin-Klassifikation gezeigt (Bismuth H 1992).

Die Ätiologie des Klatskin-Tumors ist weitgehend unklar. Jedoch besteht eine Assoziation mit der primären sklerosierenden Cholangitis bei gleichzeitig bestehender Colitis ulcerosa, Leberegelinfektion, Leberfibrose, Choledochuszyste sowie angeborenen zystischen Leberveränderungen (Herold 2008).

Tab. 1: Darstellung der Klaskin-Klassifikation (Bismuth H 1992)

<u>Typ</u>	<u>Definition</u>
I	Tumoren distal der Hepatikusgabel
II	Tumoren, welche die Hepatikusgabel erreichen
IIIa	Tumoren, welche den Ductus hepatocholedochus und den rechten Ductus hepaticus einbeziehen
IIIb	Tumoren, welche den Ductus hepatocholedochus und den linken Ductus hepaticus einbeziehen
IV	Tumoren, welche die Hepaticusgabel sowie den rechten und linken Ductus hepaticus einbeziehen

Die Häufigkeit von hepatischen Metastasen ist weitaus größer als das Auftreten von primären Tumoren. Das Verhältnis von sekundären zu primären hepatischen Malignomen beträgt in Deutschland ca. 40:1.

Durch den venösen Abfluss des Gastrointestinaltraktes über die Pfortader ist die Leber häufig von Metastasen betroffen. 95% aller Lebertumoren sind Metastasen, die vor allem durch Kolon- und Rektumkarzinome, jedoch auch durch Pankreas-, Magen- und Bronchialkarzinome entstehen können (Renz-Polster H 2008). Bis zu 50% der Patienten mit einem kolorektalen Karzinom entwickeln im Verlauf ihrer Krankheit Lebermetastasen (Herold 2008). Der Grad der Metastasierung hängt stark mit dem Tumorstadium des Primärtumors und der damit verbundenen Prognose des Patienten zusammen.

3.2 Die Bedeutung der PAE in der modernen Leberchirurgie

Die Leber kann aufgrund ihrer Funktion als Entgiftungs- und Filterorgan durch Noxen wie z.B. Alkohol oder Medikamente sowie durch Viren leicht geschädigt werden. Weiterhin ist sie häufiger Manifestationsort von hämatogenen Metastasen und Tumoren. Um eine Heilung erzielen zu können, sollte eine radikale Resektion der Tumoren angestrebt werden. Dies gestaltet sich insbesondere bei zentralen Lebertumoren schwierig, weil bei Patienten das postoperativ verbleibende Lebergewebe häufig nicht ausreicht, um die Funktionen der Leber adäquat aufrecht zu erhalten. Diese Patienten sollten im Rahmen eines multimodalen

Therapiekonzeptes auf die Operation vorbereitet werden. Dazu gehört z.B. die Drainage des biliären Systems mittels PTCD oder ERCP, um den negativen Einfluss einer Cholestase auf die hepatozytäre Funktion und die Regenerationskapazität zu reduzieren.

Zudem können Patienten mit zentralen Lebertumoren mittels Pfortaderembolisation (PAE) vorbehandelt werden. Die PAE verfolgt das Ziel der Induktion einer Atrophie des zu resezierenden Leberlappens und der Hypertrophie des kontralateralen Leberlappens durch eine relative Steigerung der Perfusion der nicht embolisierten Gefäße. Durch diese Technik kann die funktionelle Leberreserve erhöht werden und somit die postoperative Morbidität und Mortalität vermindert werden (Azoulay et al. 2000).

Ferrero et al. konnte 2007 beschreiben, dass eine erweiterte Hemihepatektomie als sicher angesehen werden kann, wenn das funktionelle Lebervolumen (FRLV) bei gesunden Patienten über 26.5% und bei Patienten mit eingeschränkter Leberfunktion (Leberfibrose/-zirrhose) über 31.0% liegt (Ferrero et al. 2007).

3.3 Geschichte der PAE

Schon in der griechischen Sagenwelt wurde über die Regenerationsfähigkeit der Leber berichtet. Als Rache des Zeus ließ er Prometheus verfolgen und an einen Felsen direkt über dem Abgrund im Kaukasus fesseln. An jedem Tag kam der Adler Ethon und fraß ein Teil der Leber des Prometheus, welche sich immer wieder regenerierte.

1920 konnte durch Rous und Larrimore an Kaninchen beobachtet werden, dass eine Embolisation der Portalvene im zu versorgenden Gebiet zur Atrophie und im kontralateralen Gebiet zu einer Hypertrophie des Lebergewebes führt (Rous 1920).

Weitere Untersuchungen von Schalm et al. an verschiedenen Tierspezies konnten dies bestätigen und zeigten, dass nach Ligatur eines Portalvenenastes der embolisierte Leberanteil atrophiert, während die restlichen Lebersegmente, die vom gesamten portalen Blutfluss versorgt werden, kompensatorisch hypertrophieren (Bax et al. 1956).

1975 berichteten Honjo et al. zum ersten Mal über eine portale Ligatur bei Patienten mit Lebertumoren (Honjo et al. 1975).

Die routinemäßige Durchführung der Pfortaderembolisation brachten Makuuchi et al. und Kinoshita et al. in den 80er Jahren in die Praxis, um Patienten mit Klaskin-Tumoren ein angemessenes kuratives Konzept anbieten zu können (Makuuchi et al. 1991), (Kinoshita et al. 1986).

Nachdem diese Methode sehr vielversprechend zu sein schien, wurde die Indikation laut de Baere et al. auf Patienten mit Lebermetastasen ausgeweitet (de Baere et al. 1993). Weiterhin wurde durch Kinoshita et al. der Einsatz der PAE an Patienten mit hepatozellulärem Karzinom berichtet (Kinoshita et al. 1986). Später wurde das Spektrum der Indikationen auf chronische Lebererkrankungen wie Hepatitis oder Leberzirrhose erweitert, weil diese heutzutage häufig mit einem HCC vergesellschaftet sind (Makuuchi et al. 1990).

Ein Problem stellt sich jedoch auch heute in der Chirurgie sekundärer Tumore, denn Elias et al. konnten 1999 feststellen, dass die Wachstumstendenzen von Metastasen nach durchgeführter PAE deutlich größer sind als die Vermehrung des gesunden Leberparenchyms (Elias et al. 1999). Diese Tatsache beruht darauf, dass primäre Lebertumoren vor allem durch das arterielle System versorgt werden, sekundäre Malignome jedoch durch das portalvenöse System. Im nicht embolisierten Leberlappen kommt es zu einem Anstieg des portalen Blutflusses, was zu einem Wachstumsreiz von eventuellen Mikrometastasen führen kann. Aufgrund dieser Tatsache sollte die Indikation für eine PAE bei sekundären Malignomen kritisch gestellt werden.

3.4 Das Prinzip der PAE

Die Leber hat die ungewöhnliche Eigenschaft, ihr Volumen den gegebenen Anforderungen anzupassen. Eine starke Veränderung des hepatischen Blutflusses, vor allem des portalvenösen Systems, kann eine Veränderung des Lebervolumens hervorrufen (Yokoyama et al. 2007a).

Sie erhält ihren Blutzufuss von zwei unterschiedlichen Systemen, dem portalvenösen und dem arteriellen System. Dabei stammen 20% des Blutes aus dem arteriellen und 80% des Blutes aus dem portalvenösen System (Yokoyama et al. 2007a).

Nach einer erfolgten Embolisation wird der Blutfluss des portalvenösen Systems im embolisierten Pfortaderast reduziert und es erfolgt ein regulatorischer Anstieg des arteriellen Blutflusses im embolisierten Leberlappen, welcher auch als „hepatic arterial buffer response“ bezeichnet wird (Lau 1985). Studien an Ratten, welche einer Embolisation der linken Portalvene unterzogen wurden, konnten zeigen, dass der arterielle Blutfluss des embolisierten Leberlappens auf bis zu 210% ansteigt und der des nicht embolisierten Lappen auf 67% absinkt (Rocheleau et al. 1999).

Wahrscheinlich hält diese Tatsache die Vitalität der Leber aufrecht und es wird eine Atrophie des embolisierten Leberlappens eingeleitet. Im Vergleich dazu steigt der portalvenöse Fluss

im nicht embolisierten Lappen an, da sich der venöse Gesamtzufluss des Blutes aus dem Splanchnikus-System nicht ändert. Dieser Effekt induziert eine Hypertrophie des nicht embolisierten Leberlappens.

Daraufhin kommt es zu einem Anstieg des FRLV (funktionelles Restlebertvolumen), was dazu führt, dass Patienten, die vorher als nicht resektabel galten, nun einer Resektion zugeführt werden können, deren Langzeitergebnisse als akzeptabel einzuschätzen sind. Patienten, die sich einer PAE unterzogen haben, zeigen im Vergleich zu Patienten, die ohne PAE reseziert wurden, nach einem Jahr eine 31% niedrigere Rezidivrate, weil eine großzügigere Resektion im gesunden Gewebe ermöglicht und damit die Wahrscheinlichkeit einer absoluten Tumorfreiheit der Resektionsgrenzen gesteigert werden kann (Azoulay et al. 2000, Neuhaus et al. 2003).

3.5 Indikationen für eine PAE

Die Resektion von primären oder nicht metastasierten sekundären Malignomen stellt im Moment den Goldstandard im Rahmen der Therapie dieser Erkrankungen dar. Gerade bei zentralen Lebertumoren, wie z.B. dem Klatskin-Tumor, dem Gallenblasen-Karzinom oder einem zentralen HCC muss eine erweiterte rechte Hepatektomie durchgeführt werden, um eine R0-Resektion sicher gewährleisten zu können.

Bei einer R0-Resektion kann es zu einem enormen Gewebeverlust kommen, welcher häufig in eine postoperative Leberinsuffizienz mündet. Diese verursacht noch immer den größten Teil der Mortalität nach großen Leberresektionen (Fong et al. 1999).

Man sollte die Indikation einer PAE gut überprüfen und dabei Faktoren wie zugrunde liegende Lebererkrankungen, z.B. Virushepatitis, Speichererkrankungen oder Pfortader-Thrombose ausschließen. Weiterhin sollte auf Komorbiditäten der Patienten geachtet werden, da z.B. ein Diabetes mellitus die regenerative Hypertrophieleistung der Leber stark einschränken kann.

Das Alter oder pulmonale sowie kardiale Risikofaktoren gelten heutzutage wie auch in anderen chirurgischen Bereichen nicht mehr als absolute Kontraindikation, da sich das chirurgische und anästhesiologische Management stark verbessert hat (Bechstein und Gollig 2005).

Für die Chirurgie der Metastasen werden klare Grenzen gesetzt. Abgesehen von wenigen Ausnahmen wie z.B. Nebennierenmetastasen oder Patienten mit sehr gutem Ansprechen auf

eine vorgeschaltete systemische Chemotherapie wird die Anwesenheit von extrahepatischen Krankheiten als Kontraindikation für die Resektion angesehen (Song et al. 2005).

3.6 Techniken der PAE

Um das FLRV zu vergrößern und das restliche Lebergewebe zu konditionieren, wurden verschiedene Techniken der Pfortaderembolisation entwickelt.

Es ist wichtig darauf zu achten, dass die Embolisation den gesamten Gefäßquerschnitt umfasst, damit eine nahezu komplette portale Blutflussumleitung in die nicht embolisierten Lebersegmente erfolgen kann.

Es gibt prinzipiell zwei Arten zur Durchführung der PAE: entweder die direkte perkutane Punktion eines Portalastes im Leberparenchym oder durch Präparation und Katheterisierung der Portalvene über die V.ileocolica und die V.mesenterica superior.

Am Universitätsklinikum Jena kommt das Verfahren der perkutanen transhepatischen Pfortaderembolisation zur Anwendung. Dieser Eingriff wird in Allgemeinanästhesie oder Neuroleptanalgesie durchgeführt. Der Patient liegt hierbei auf dem Rücken während der Verlauf der Pfortaderäste mittels eines abdominalen Ultraschalls ermittelt wird. Die Punktion des Pfortaderastes erfolgt mit einer 22-Gauge-Chiba-Nadel. Die korrekte Lage der Hohlnadel wird mittels einer leichtgängigen Aspiration von Portalblut in eine Spritze überprüft. Danach erfolgt die Einführung eines Führungsdrahtes in den Gefäßbaum, ein Kanülenwechsel hin zu einer größer lumigen Kanüle und ein Wechsel auf einen stärkeren Führungsdraht mittels Seldinger-Technik. Durch Rotationsbewegungen kann der Führungsdraht in peripherere Anteile der Pfortader eingeführt und diese Gefäßanteile nachfolgend katheterisiert werden. Durch die Applikation eines röntgenstrahlendichten Kontrastmittels über den Katheter kann nun das gesamte Portalsystem darstellen werden (Castaing 2007).

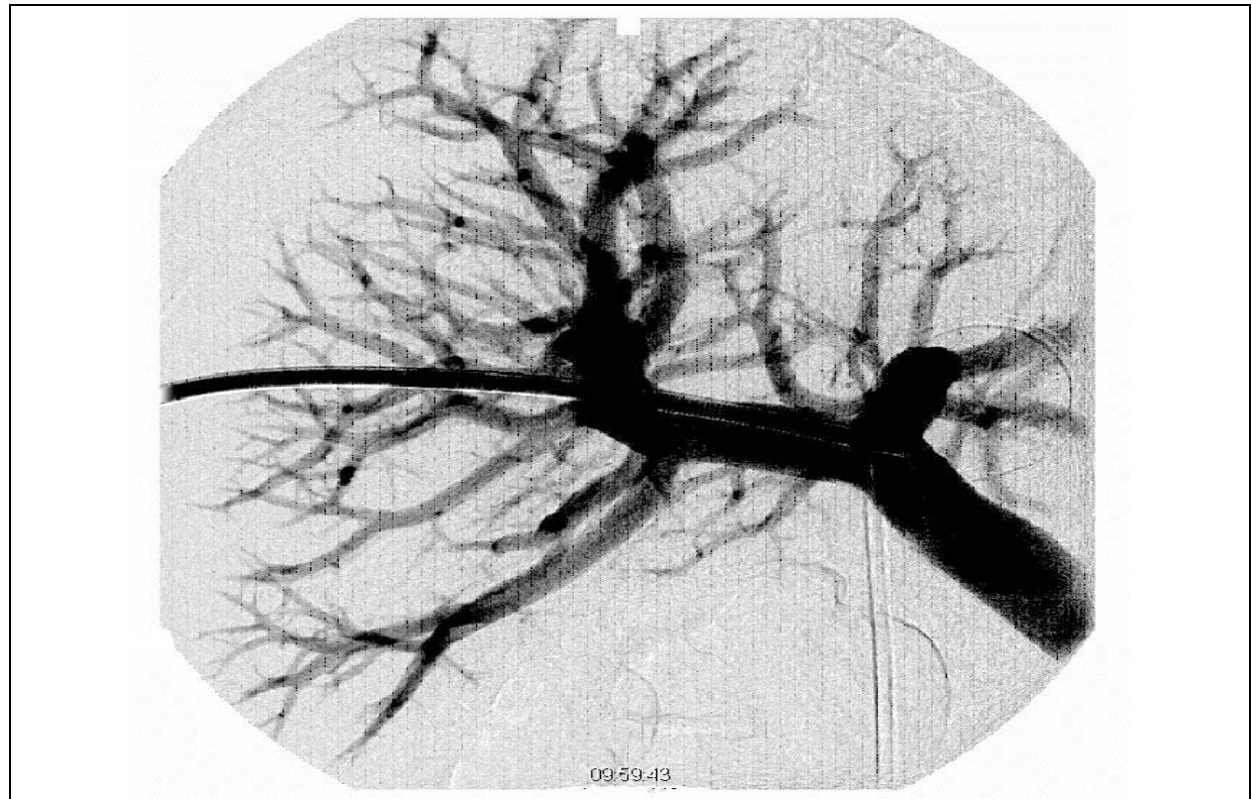


Abb.1: Darstellung des Portalsystems mittels Kontrastmittel vor Pfortaderembolisation

Danach wird der Führungsdraht wieder eingeführt und darüber ein Katheter eingebracht. Nun kann die Embolisation erfolgen. Der zu embolisierende Gefäßast der Pfortader kann mit verschiedenem Material, wie z.B. Gelatine Schwämmchen (Tsuda et al. 2006), Coils (Madoff et al. 2003), Polyvinyl Alkohol (Covey et al. 2005) oder Lipiodol (Kakizawa et al. 2006) verschlossen werden. Die Embolisation erfolgt unter Durchleuchtung.

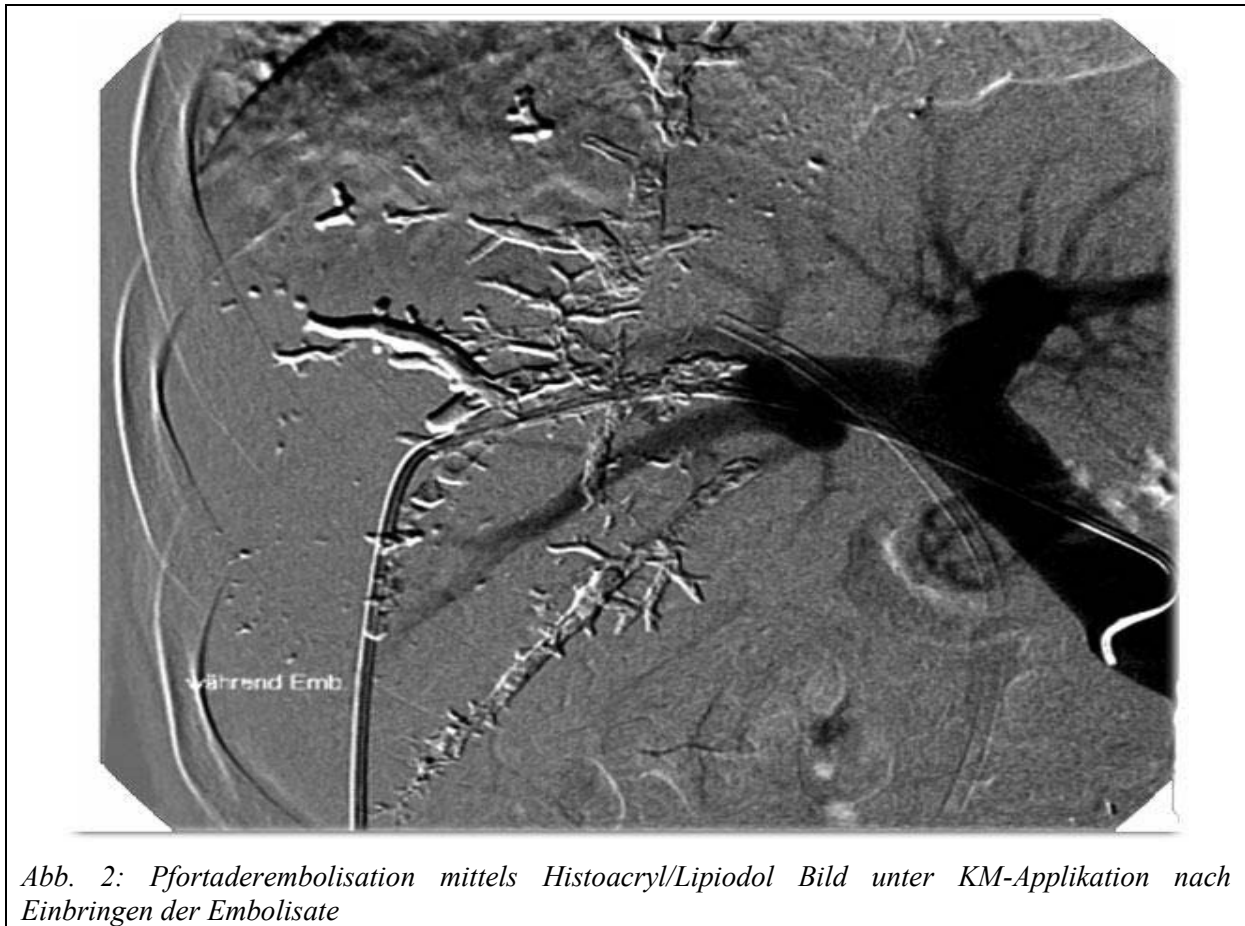


Abb. 2: Pfortaderembolisation mittels Histoacryl/Lipiodol Bild unter KM-Applikation nach Einbringen der Embolisate

Alternativ kann die Katheterembolisation über eine Katheterisierung der V.ileocolica erfolgen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass man leichter alle Segmentäste katheterisieren kann, jedoch besteht der Nachteil darin, dass das Peritoneum eröffnet werden muss (Castaing 2007).

Um die Auswirkungen der PAE quantifizieren zu können, sollte eine CT gestützte Volumenbestimmung vor der geplanten Embolisation und 4 Wochen danach erfolgen. Das Beispiel der Abb. 3 verdeutlicht dies: Vor der PAE wäre ein maximales postoperatives Leberrestvolumen von 17,8% des ursprünglichen Lebervolumens des Patienten zu erwarten gewesen. Durch das Verfahren der PAE konnte dieses auf 21,5% des ursprünglichen Lebervolumens vergrößert werden. Dies entspricht einem relativen Zuwachs um 17,2%.

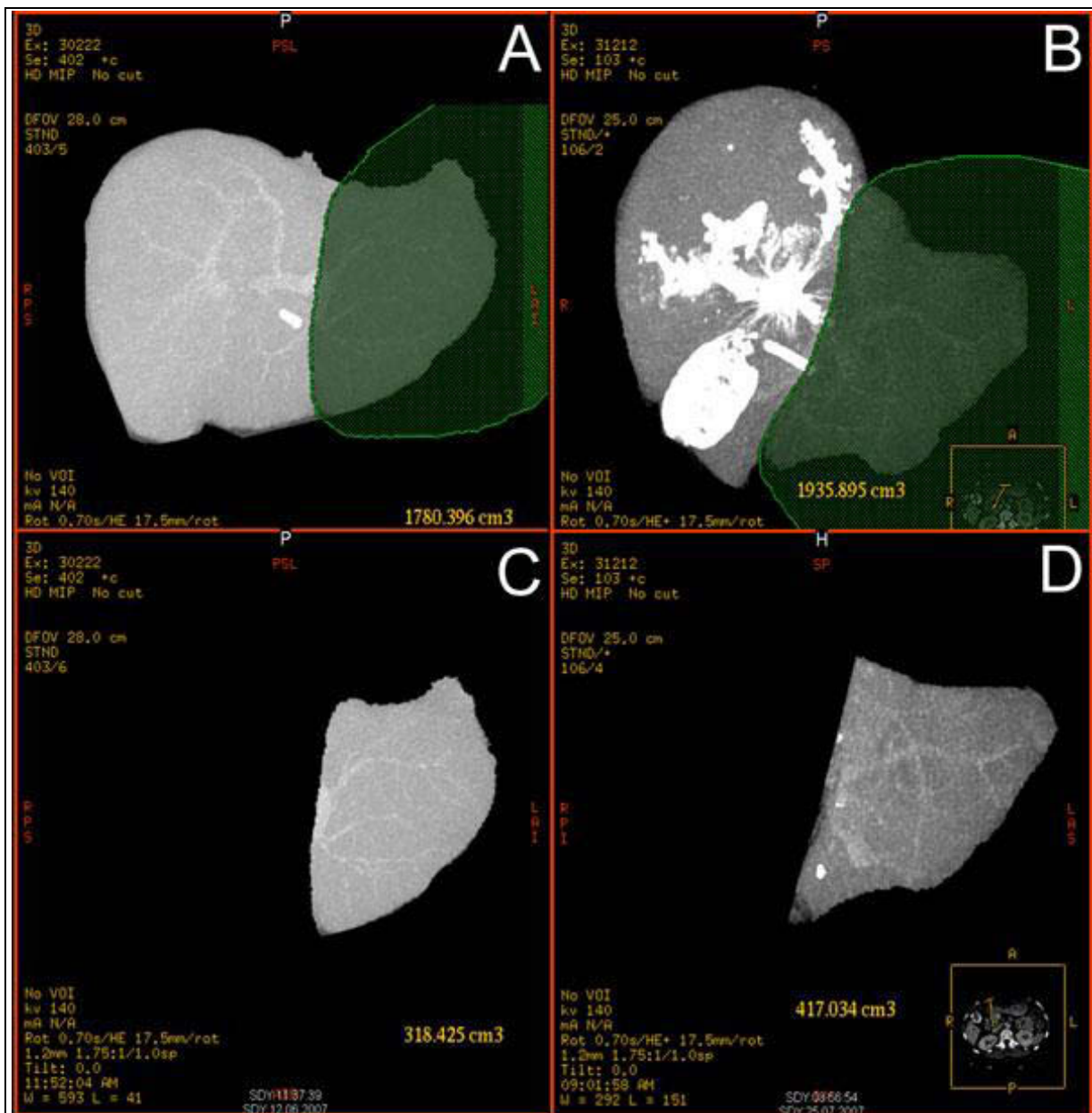


Abb. 3: CT-Darstellung, Pfortaderembolisation wegen Gallenblasen-Ca.
 Volumetrie vor Embolisation:

A: Totales Lebervolumen: 1780 cm³, **C:** Volumen Segmente 2/3: 318 cm³
 => postoperativ 17,8 % des ursprünglichen Lebervolumen in situ

Volumetrie nach Embolisation:

B: Totales Lebervolumen: 1936 cm³, **D:** Volumen Segmente 2/3: 417 cm³
 => postoperativ 21,5 % des ursprünglichen Lebervolumens in situ

3.7 Risiken der PAE

Von Madoff et al. werden vorübergehende Hämobilie, Dünndarmileus und Beeinträchtigung der arteriellen Leberversorgung als häufigste Komplikationen beschrieben. Zudem stellen Blutungen aus dem Stichkanal, vor allem nach Stichverletzungen eines Leberarterienastes, sowie Hämoperitoneum, arteriovenöse bzw. arterioportale Fisteln mit Shuntoperfusion, Pneumothorax und Sepsis weitere charakteristische technische Komplikationen einer Pfortaderintervention dar (Madoff et al. 2005).

Di Stefano et al. hat bisher eine der größten Patientenserien mit 188 Patienten veröffentlicht; darunter fanden sich 12 Fälle (6,4%) mit relevanten Komplikationen, wie Pfortaderthrombose im nicht embolisierten Segment (n=1), Migration von Embolisationsmaterial (n=2), Hämoperitoneum (n=1) sowie transiente Hämobilie (n=1). Eine transiente Leberinsuffizienz erlitten sechs Patienten, darunter fünf Patienten mit vorbestehender Leberzirrhose (Di Stefano et al. 2005)

3.8 Biochemische und molekulargenetische Veränderungen nach PAE

Biochemische und molekulargenetische Veränderungen sind verantwortlich sowohl für die Apoptose des embolsierten Leberlappens als auch für die Proliferation des kontralateralen Lappens.

Im Lebergewebe erfolgt unmittelbar nach der portalen Embolisation eine Erhöhung des Bilirubins und der LDH, jedoch ist keine Änderung der alkalischen Phosphatase, der Transaminasen, der gamma-GT sowie der Indocyaningrün-Exkretion erkennbar (Castaing 2007).

Weiterhin steigen nach der PAE Interleukin 6 (IL-6) und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF alpha) im Blutserum an (Yokoyama et al. 2007b). Die beiden proinflammatorischen Zytokine bereiten die Hepatozyten auf das Wachstum vor. IL 6 z.B. spielt eine wichtige Rolle in der Transduktion und Aktivierung des STAT, welcher die Apoptose inhibiert (Tarla et al. 2006). Später lässt sich ein Anstieg vieler weiterer Wachstumsfaktoren im Serum feststellen, wie z.B. des hepatocyte growth factor (HGF), welcher für die Differenzierung aus einer Stammzelle in einen Hepatozyt verantwortlich sein soll (Kollet et al. 2003). Weiterhin spielen der transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) und epidermal growth factor (EGF) eine wesentliche Rolle für das Wachstum der Leber. Zudem steigt die Expression von Transkriptionsfaktoren wie z.B. c-fos, c-jun und c-myc an, welche der Stimulation der DNA-

Synthese dienen (Brenner 1998). Dies konnte im Rahmen der Leberregeneration (Olazabal et al. 2009) in Keratinozyten (Nguyen et al. 2000), im Knochen (Hatton et al. 2003) und in der Niere (Itoh et al. 2000), sowie in der Differenzierung von embryonalen Stammzellen in Ektoderm und Entoderm (Binetruy et al. 2007) nachgewiesen werden. Es gibt noch viele weitere Faktoren, die eine wichtige Funktion für die Einleitung des Leberwachstums spielen. Die Mechanismen, die die Proliferation der Leber beenden, wenn sie das Volumen erreicht hat, welches nötig ist, um ihre Funktion im Organismus aufrecht zu erhalten, sind kaum verstanden. Dennoch wurden Faktoren entdeckt, die die Regeneration limitieren könnten und somit eine wichtige Funktion in der Regulation des Wachstums spielen. Zu diesen Faktoren gehören unter anderem TGF beta und activin and suppressor of cytokine signalling (SOCS) (Taub 2004).

Dennoch ist der genaue molekulare Mechanismus der Leberregeneration noch immer unklar. Ziel dieser Studie war es daher, die Genexpression verschiedener Kandidatengene im Rahmen der Proliferation und Atrophie der Lebergewebe nach PAE anhand von Leberbiopsaten vor und nach Embolisation zu untersuchen

4 Ziele der Arbeit

Bei primären und sekundären Tumoren der Leber besteht der einzige kurative Therapienansatz in einer radikalen operativen Resektion. Entscheidend, ob eine sichere Entfernung der Lebertumoren durchgeführt werden kann, ist hierbei das postoperative Leberrestvolumen. Dieses ist insbesondere bei der erweiterten Hemihepatektomie des rechten Leberlappens häufig nicht ausreichend, um die Funktion der Leber aufrecht zu erhalten.

Die präoperative Pfortaderembolisation hat sich als geeignetes Hilfsmittel zur Induktion einer Hypertrophie des kontralateralen Leberlappens erwiesen. Jedoch erlaubt der aktuelle Wissensstand noch immer keine lückenlose Erklärung der pathophysiologischen Mechanismen und Signalwege.

Im Rahmen einer Hypothese generierten Untersuchung sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- (1) In Abhängigkeit von der Embolisation verändert sich das Genexpressionsprofil in der Leber.
- (2) In Abhängigkeit von der Embolisation ändert sich das Muster der Proteinbiosynthese in der Leber.

Zur Aufklärung der komplexen Vorgänge soll anhand von zehn Patienten mit jeweils drei Leberproben vor Embolisation, aus dem embolisierten Leberlappen und aus dem nicht embolisierten Lappen das Genexpressionsprofil mithilfe der Real-Time-quantitative-PCR untersucht werden.

Das Muster der Proteinbiosynthese wurde nach immunhistologischer Aufarbeitung mittels des Laser Scanning Mikroskop LSM 510 meta® qualitativ analysiert.

5 Material und Methoden

5.1 Probenentnahme

Die Probensammlung und Asservierung erfolgte durch das Team der Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Jena.

Zehn Patienten mit einem zentralen Lebertumor, welche zur Konditionierung einer Trisektorektomie rechts eine PAE benötigten, wurden in die Studie aufgenommen. Weitere Details über die Patienten sind in Tabelle 18 zusammengefasst. Alle Patienten wurden einer CT vor der PAE und prä-operativ unterzogen, welche das totale Lebervolumen (TLV) und das funktionelle Restlebertvolumen (FLRV) der Lebersegmente 2 und 3 vor und nach der PAE erfasste. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 19 dargestellt.

Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission zugelassen.

Vor der perkutanen Embolisation der rechten Pfortader wurde eine Leberbiopsie aus tumorfreien Lebergewebe entnommen. Im Median erfolgte 40 Tage (34-55Tage) nach der Pfortaderembolisation eine Exploration der Patienten, im Falle von Resektabilität wurde eine Trisektorektomie rechts vorgenommen. Intraoperativ wurde sowohl aus dem embolisierten als auch dem nicht-embolisierten Leberlappen jeweils eine Keilbiopsie entnommen, welche sofort in flüssigem Stickstoff kryokonserviert wurde.

5.2 Materialien und Lösungen

5.2.1 Materialien für die Real-Time-quantitativen-PCR

cDNA-Synthese	QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen (Hilden, Deutschland)
Real Time PCR	RT ² -Real-Time SYBR Green/Fluorescein PCR Master Mix, SABiosciences TM (San Francisco, USA)
DNA-Aufreinigung	QIAquick® PCR-Purifikation Kit, Qiagen (Hilden, Deutschland)

5.2.2 Materialien und Lösungen für die Immunfluoreszenz

Waschpuffer (PBS 10x)

Zur Herstellung des Waschpuffers wurden 160g Natriumchlorid, 58g Dinatriumhydrogenphosphat, 4g Kaliumhydrogenphosphat und 4g Kaliumchlorid auf 1,8l mit dreifach destilliertem Wasser aufgefüllt. Im Anschluss wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und es erfolgte eine weitere Auffüllung mit dreifach destilliertem Wasser auf 2,0l.

Waschpuffer (Tris-EDTA)

Zur Herstellung des Waschpuffers wurden 12,1g von 100mmol/l TRIS, 3.72g von 10mmol/l EDTA mit dreifach destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 800ml aufgefüllt, nachfolgend wurde der pH-Wert auf 9,0 eingestellt und ein Endvolumen von einem Liter durch weitere Zugabe von dreifach destilliertem Wasser erreicht.

Antikörperdiluent

Als Antikörperdiluent wurde Dako REAL Code S2022 (Dako) verwendet.

Negativkontrolle

Die Negativkontrolle war eine kommerziell verfügbare Mischung aus Maus-IgM und den vier Maus-IgG-Subklassen IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} und IgG₃ Code N1698 (Dako).

Eindeckmedium

Zur Herstellung des Eindeckmediums wurden 10mg Mowiol 4-88 (Calbiochem) und 10g Mowiol 40-88 (Aldrich) in 220ml PBS-Puffer gegeben und 10 Stunden gerührt, nachfolgend wurden 110 ml Glycerin (Roth) hinzugegeben und 16 Stunden gerührt, anschließend wurden 300mg DABCO (Aldrich) zugegeben und weitere 16 Stunden gerührt. Zur Entfernung von Luftblasen wurde abschließend mit 4000 U/min für 15 Minuten zentrifugiert.

DAPI

Zur Kernfärbung wurde 4',6-Diamidino-2-phenylindol, Katalog-Nummer D9542, D8417 und D9564 (Sigma Aldrich), verwendet.

Humanes Immunglobulin G

Als humanes Immunglobulin G wurde eine kommerziell verfügbare Mischung aus humanem IgG₁, IgG₂, IgG₃ und IgG₄ verwendet (Beriglobin, ZLB Behring).

Parafin zur Gewebefixierung

Im Rahmen der Herstellung des Fixationsmediums wurden 40g Paraformaldehyd mit 100ml 10xPBS auf 800ml mit dreifach destilliertem Wasser aufgefüllt und bei 70°C im Wasserbad gelöst. Am nachfolgenden Tag erfolgte die Einstellung eines pH-Wertes von 7,0 und das Auffüllen auf ein Gesamtvolumen von 1 Liter durch Zugabe von dreifach destilliertem Wasser.

5.3 Geräte und Software

5.3.1 Geräte und Software für die Real-Time-quantitativen-PCR

cDNA-Synthese	PTC-200 Peltier Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories
Real-Time PCR	iCycler TM mit iCycler iQ-Software (Version 3.1.0.7050), Bio-Rad Laboratories
Spektrophotometrie	Nanodrop® ND-1000 mit entsprechender Software: Nanodrop 3.1.2.
Zentrifuge	Eppendorf Zentrifuge 5415D

5.3.2 Geräte und Software für die Immunfluoreszenz

LSM	Laser Scanning Mikroskop LSM 510 meta®, Carl Zeiss GmbH Jena
Wasserbad	MultiGourmet, Braun GmbH, Kronberg
Vortex	Genie 2 TM, Scientific industries, Bohemia, N.Y., USA
Labor-pH-Meter	inoLab pH Level 2, WTW GmbH, Berlin
Histokinette	Leica TP 1020, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrotom	Leica RM 2165, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Einbettungsstation	Leica EG 1160, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Software	Carl Zeiss LSM Image Examiner ® und Image Browser® Version 3.5.0.376

5.4 Real-Time-quantitative-PCR

5.4.1 Primer für die Real-Time-quantitative-PCR

Nachfolgend sind tabellarisch die für die entsprechenden Gene verwendeten Primer in sense- und antisense-Richtung und die Größe der amplifizierten Produkte aufgeführt. Alle Primer wurden von der Firma biomers.net GmbH (Ulm, Deutschland) hergestellt.

Gen-Bezeichnung	Produktlänge	Sequenz Forward Primer		Sequenz Reverse Primer	
ADCY3	199	5'-	CCAGCTTCCTCAAAGTCCAG -3'	5'-	GCTCATCTTCAGAGGCATCC -3'
AIFM1	170	5'-	AGAGGGGGTTAAGGTGATGC -3'	5'-	CTATTTCCAGGCCACCAGTC -3'
ATP6V0E2	104	5'-	AGTATCCTGTTCCGCCTCCT -3'	5'-	GTCAGAGCCAAACCTGCACT -3'
COX15	174	5'-	CAGTGTCCCTTCCCTCAAAG -3'	5'-	CTTGGCTTGTAGGTGGCTTC -3'
DENND2A	119	5'-	GTCCTTGTGGTTGACCTCGT -3'	5'-	AGTCGTTCTCTGTTCAG -3'
EDN1	102	5'-	AAACCCACTCCAGTCCAC -3'	5'-	GATGTCCAGGTGGCAGAAGT -3'
EDNRA	170	5'-	AGTCTTGCCCTTGAGACCT -3'	5'-	CAGAGGTTGAGGACGGTGAT -3'
ELMO1	178	5'-	AAACATCCAGATCCCTGACG -3'	5'-	TACCAAAGGACGGTTCCAAG -3'
ENO3	119	5'-	AGTCCTGAAGGCTGTGGAGA -3'	5'-	CGGTCCCATCTAGCTCAATC -3'
HADH	116	5'-	CGGCAAGAAGACTGGAGAAG -3'	5'-	GCATTCCACAGGCACTC -3'
NOTCH4	174	5'-	GTCCTCCCTCCTTCTGTTC -3'	5'-	ACTGGATCTGGGGGTATGTG -3'
PSME2	167	5'-	GAAAGTCCTGTCCCTGCTTG -3'	5'-	TGACGGCATTCACCTCT -3'
PUM1	183	5'-	AAGGACAGCAGCAGGTTCTC -3'	5'-	AGTAAGCAGCAGGAGCCAAC -3'
STAT4	80	5'-	GGCGTCAGCGGCTTTCCTCCT -3'	5'-	CTCAGCACAGGTCCAGGCA -3'
EGR1	166	5'-	GAGAAGGTGCTGGTGGAGAC -3'	5'-	GTGGGTTGGTCATGCTCAC -3'
AHSA2	153	5'-	CTTCCGACAGACCTTTCCAC -3'	5'-	CTGCCCTTTCCACTACGTTT -3'
ETFB	113	5'-	GAACCCCTTCTGTGAGATCG -3'	5'-	GAATCGTCTCCTGGCACTGT -3'
IGFBP1	122	5'-	CCCAGAGAGCACGGAGATAA -3'	5'-	GAGCCTTCGAGCCATCATAG -3'
IGFBP2	152	5'-	GCAGAAAACGGAGAGTGCTT -3'	5'-	AGCAAGAAGGAGCAGGTGTG -3'
RHOB	197	5'-	GGAGAACATCCCCGAGAAG -3'	5'-	CGAGGTAGTCGTAGGCTTGG -3'
TGFBR2	162	5'-	GGATTGCTCACCTCCACAGT -3'	5'-	CCACAGACAGAGTAGGGTCCA -3'
TGFBR3	128	5'-	CAGTCCACATCCACCACAAG -3'	5'-	CACAGAACCCTCAGACACCA -3'
VEGFA	199	5'-	GCCAGGGCATGGGGGCAAAT -3'	5'-	GCGTGCAGCATGTGGAGGGA -3'
WNT5B	192	5'-	GGGTGGGTGCTATACAATGG -3'	5'-	CCGTGGTGGACAGACAGTAA -3'
ICAM1	116	5'-	CACCTATGGCAACGACTCCT -3'	5'-	GTGTCTCCTGGCTCTGGTTC -3'
PLCB1	124	5'-	ACGGAGTCGTTTACCTGAG -3'	5'-	GAGGAGTTTCCAGCCAGTTG -3'
GALC	112	5'-	CGTTTCCTCAGCCTCATCTC -3'	5'-	CTCCCTCCTCCACACATA -3'
IL1B	121	5'-	CACGATGCACCTGTACGATCA -3'	5'-	GTTGCTCCATATCCTGTCCCT -3'
IL8	139	5'-	CAGGAATTGAATGGGTTTGC -3'	5'-	AGCAGACTAGGGTTGCCAGA -3'
hHPRT1	131	5'-	CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT -3'	5'-	AGACGTTACAGTCCTGCCATAA -3'

Tab. 2: Bezeichnung und Sequenz der Primer für die RTq-PCR: Die Elongation durch die im PCR-Master-Mix enthaltene Taq-Polymerase erfolgt am 3'-Ende des jeweiligen Primers.

5.4.2 Datenbanken

Verifizierung der Primer	http://www.ensembl.org
Primerdesign-Software	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
Blasten	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi
Gensequenzen	http://www.pubmed.gov

5.4.3 RNA-Isolation und Bead Array-Technologie

Die Isolation der mRNA erfolgte mit RNeasy-mini-kit (qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll bei der Firma SIRS-Lab, Jena.

Die gewonnene RNA wurde nun einer Genexpressionsanalyse unterzogen. Hierbei bedienten wir uns der sog. „Bead Array“-Technologie. Dabei wurden die Oligonukleotide nicht an einer planaren Oberfläche in Form von sog. Spots, sondern an „Beads“ immobilisiert. Diese Beads mit einem Durchmesser von nur 3µm wurden während des Herstellungsprozesses in kleinen Vertiefungen assembliert. Die Position der Beads, die jeweils hunderttausende Kopien eines genspezifischen Oligonukleotids trugen, wurden durch den Hersteller in einem Dekodierungsschritt bestimmt. Dazu diente eine 23 Basen lange Code-Sequenz, die an den genspezifischen Bereich synthetisiert wurde. Dadurch wurde auch eine umfassende Qualitätskontrolle möglich, denn nur funktionale Beads wurden in die Expressionsanalysen einbezogen. Eine weitere Eigenschaft bedingte die hohe Qualität der Daten, ihre Konkordanz und Reproduzierbarkeit: jedes Bead ist durchschnittlich 30mal auf dem einzelnen Array vorhanden, daher wird ein Expressionssignal aus vielen, über den Array verteilten Datenpunkten generiert, technische Effekte also minimiert.

Das Prinzip der Hybridisierung komplementärer Nukleinsäureabschnitte fand auch bei der Bead-Array-Technologie Anwendung. Die biologische Probe (totalRNA) wurde in zwei Reaktionsschritten revers transkribiert und dann linear amplifiziert, wobei ein modifiziertes Nukleotid eingebaut wurde, welches die Fluoreszenzdetektion der am Array gebundenen Moleküle gewährleistete. Durch den Amplifikationsschritt war es möglich, Genexpressionsanalysen mit deutlich weniger RNA durchzuführen als bisher: 100-200ng totalRNA reichten aus. Dies war ein spezifischer Vorteil für das vorliegende Vorhaben, da RNA aus den Patientenproben z.T. nur in sehr geringen Mengen vorlag. Alle identifizierten Transkripte, die als differenziell exprimiert gefunden wurden, wurden gemäß MIAME-Kriterien für Arrayexperimente mittels Real-Time-quantitativ-PCR bestätigt.

5.4.4 Statistische und bioinformatische Analysen der Bead-Array Technologie

Die statistische Analyse wurde von SIRS-Lab GmbH durchführt.

Die Daten-Analyse wurde mit Hilfe der Programme R statistics software (Version 2.8) und BioConductor (Version 2.3) durchgeführt.

Die normalisierten Daten wurden auf ihre Qualität und ihr Hintergrundrauschen untersucht. Dabei wurden solche als Beadtypen identifiziert und folglich für die statistische Analyse ausgewählt, die den Herstellerangaben entsprechend in mindestens 15 Proben ein

Detektionsniveau von $p < 0.01$ aufwiesen. Beadtypen, die dieses Kriterium erfüllten, wurden einer weiteren Analyse zugeführt.

Die Beadtypen wurden auf Entrez Gene ID von Illumina Inc. (version R4 from May 2008) abgebildet. Beadtypen, welche die Qualitätskontrolle nicht überstanden hatten, wurden entfernt. Gene, welche Unterschiede in der Expression zeigten, wurden in Hinblick auf die Gruppen Leberproben vor Embolisation, Proben aus dem embolisierten Leberlappen und Leberproben aus dem nicht embolisierten Lappen untersucht. Dabei wurde der zweiseitige gepaarte Wilcoxon-Rangsummen-Test angewandt, welcher von einer Nicht-Normalverteilung der Werte ausgeht. Nach den MAQC-Kriterien zur Detektion der DEGs wurde ein statistischer Test angewandt, der die Varianz und mittleren fold change beinhaltet. Der Grenzwert für die erhaltenen p-Werte wurde auf $p < 0,005$ festgelegt und die Gene wurden in hoch- und runterregulierte Gruppen eingeteilt.

Um einen genaueren Überblick über die Genregulation zu erhalten, wurde die Gen Set Enrichment Analyse mithilfe des DAVID (the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) durchgeführt.

5.4.5 Quantifizierung der RNA

Die RNA-Konzentrationen wurden spektrophotometrisch gemessen. Hierzu wurde eine Probenmenge von 1 μl zwischen zwei Glasfaserenden appliziert und die Schwächung des Lichtes, eines pulsierenden Xenon-Blitzlichtes, gemessen. Die Messung erfolgt in einem Absorptionsbereich zwischen 220 und 350nm. Nach dem Lambert-Beer-Gesetz (1) kann entsprechend der erhaltenen Absorptions-Daten bei 260 nm eine Berechnung der RNA-Konzentration mittels eines Absorptionskoeffizienten von 40 ng-cm/ μl für RNA-Proben erfolgen.

(1) Lambert-Beer-Gesetz: ~~$$E = e \cdot c \cdot d$$~~

E-Extinktion; e-Absorptionskoeffizient; λ -Wellenlänge

Die Bestimmung der Extinktion erfolgt auf Grundlage des negativen dekadischen Logarithmus des Quotienten aus der Lichtintensität der Probenmessung und der Lichtintensität nach einer Kalibrierung des Photometers mit RNase-freiem Wasser.

5.4.6 cDNA-Synthese

Das Verfahren der Real-Time-quantitative-PCR verlangt eine DNA-Sequenz als Matrize, es ist daher notwendig, die isolierte RNA in eine sogenannte cDNA zu überführen. Hierbei bedient man sich dem Prinzip der reversen Transkription.

Die Synthese der cDNA wurde mit dem Quanti Tect Reverse Transcription Kit von Qiagen (Hilden) durchgeführt. Eine Standardisierung konnte durch die Verwendung von jeweils 2µg totRNA, entsprechend der spektrophotometrischen Messergebnisse, gewährleistet werden.

Reaktionsansatz

xµl	2µg totRNA (entsprechend der Ergebnisse aus der Spektrophotometrie)
2µl	7X gDNA Wipeout Buffer
<u>14µl – (x µl + 2µl)</u>	RNAse-freies Wasser
14 µl	

Es folgte eine Inkubation für 10 Minuten bei 42°C.

Zu den 14 µl wurde anschließend folgende Lösung hinzugegeben:

1µl	Quantiscript RT
4µl	5X Quantiscript RT Buffer
<u>1µl</u>	RT Primer Mix
6 µl	

Die reverse Transkription, der nun in einem Gesamtvolumen von 20µl vorliegenden Lösung, erfolgte im Thermocycler nach folgenden Parametern:

Synthese des komplementären Nukleinsäurestranges	35 Minuten	bei 42°C
Inaktivierung der reversen Transkriptase	3 Minuten	bei 95°C
Kühlung der synthetisierten cDNA		bei 4°C

Nachfolgend wurden die Proben auf eine Konzentration von 6ng/µl verdünnt.

5.4.7 Primeretablierung

Eine Etablierung der verwendeten Primer ist in Hinblick auf die Evidenz einer Real-Time-quantitative-PCR von großer Bedeutung, daher wurden die nachfolgend verwendeten Oligonukleotide auf Basis einer Gendatenbank (siehe 5.4.2 Datenbanken) mittels spezieller Programme (siehe 5.4.2 Datenbanken) ausgewählt.

Ziel war es, Primer mit einer Länge von 22 ± 2 Basenpaaren zu generieren, die eine hochspezifische Amplifikation einer Sequenz von 80 bis 200 Basenpaaren ermöglichen. Weiterhin sollten die Anforderungen einer Schmelztemperatur (T_m) von 60 ± 2 °C und eines Anteils der organischen Basen Guanin und Cytosin von circa 45-65% erfüllt sein. Darüber hinaus wurde darauf geachtet, dass innerhalb der Primer keine homologen Sequenzmotive auftreten, um die Entstehung von Primer-Dimeren zu vermeiden. Die Spezifität für die entsprechenden Gene wurde mittels einer Genomdatenbank (5.4.2 Datenbanken) sichergestellt.

Alle in Tabelle 2 dargestellten Primern besaßen die geforderten Eigenschaften.

Die Herstellung der verwendeten Oligonukleotide erfolgte durch die Firma biomers.net GmbH (Ulm, Deutschland).

Die Effizienz der Primer wurde unter Zuhilfenahme der cDNA eines Pools aus den verschiedenen RNA-Proben ermittelt. Hierzu wurden jeweils 2 µl aus 11 verschiedenen willkürlich gewählten totRNA-Proben in einem totRNA-Pool zusammengeführt. Diese totRNA wurde photospektrometrisch quantifiziert und nach dem oben beschriebenen Prinzip in eine cDNA umgeschrieben, welche letztlich als Grundlage der Effizienzmessung der Primer diente.

Für jedes Primerpaar wurde nachfolgend über 50 Zyklen das Amplifikations-Produkt gewonnen und im Anschluss mit dem PCR-Purification Kit (SABiosciencesTM) aufgereinigt. Ziel der Aufreinigung war hierbei die Elimination von SYBR-Green, Proteinen und überschüssigen Nukleotiden und Nukleinsäuren mit einer Länge unter 70 Basenpaaren.

Anschließend wurde für die Ermittlung der Standarddaten (Effizienz und Schmelztemperatur) eine Verdünnungsreihe, beginnend mit einer Konzentration von 1 pg/µl und sechs weiteren Verdünnungen von 1:10, angefertigt und mit den einzelnen Verdünnungen in einer Dreifachbestimmung die Menge der Amplifikate in einer weiteren quantitativen PCR bestimmt. Für jede Verdünnung wird durch Mittelung ein Wert bestimmt. Eine Regressionsgerade kann mit Hilfe aller Einzelwerte einer Verdünnungsreihe konstruiert

werden. Der Anstieg dieser Gerade spiegelt hierbei die Effizienz wider. Alle Primer erreichten hierbei die Mindestanforderung von mehr als 65%. Außerdem konnte eine Abweichung der Schmelztemperaturen der einzelnen Primer im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen ausgeschlossen werden.

Für einige Primer konnten höhere Effizienzen bei einer Annealing-Temperatur von 59°C statt der sonst verwendeten 60°C erzielt werden, dies waren im Einzelnen: WNT5B, PLCB1, VEGFA, ELMO1, AIFM1, COX15, ENO3, NOTCH4, PUM1, EGR1. Es erfolgte daher eine entsprechende Modifikation der Annealing-Temperatur im PCR-Programm für diese Primer.

5.4.8 Bestimmung der Genregulation mittels Real-Time-quantitative-PCR

Die in 5.4.5 synthetisierte cDNA bildet die Matrize für die nachfolgende Real-Time-quantitative-PCR. Mit ihrer Hilfe lassen sich spezifische Nukleinsäuresequenzen amplifizieren und gleichzeitig hinsichtlich ihrer Quantität analysieren. Hierbei liegt das Prinzip einer Polymerase-Kettenreaktion zu Grunde, ergänzend wird ein Fluoreszenzmarker (SYBR Green, Fa. SABiosciences) mitgeführt, der doppelsträngige DNA markiert und somit Rückschlüsse auf die initial vorliegende cDNA- und damit auch RNA-Menge zulässt.

Das Pipettieren erfolgte mit Hilfe eines Pipettierroboters, um eine bessere Standardisierung zu erreichen. Nachfolgend wurde die Real-Time-PCR im iCycler der Firma Bio-Rad durchgeführt. Dieses Gerät vereint die Eigenschaften eines Thermocyclers und die eines Fluorimeters. Die Messung des SYBR-Greens wird hierzu bei einer Wellenlänge von 490nm während des Anealing-Schrittes der PCR durchgeführt.

Der Reaktionsansatz für die Real-Time-quantitative-PCR hatte ein Gesamtvolumen von 20µl und setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

5 µl	Probe (mit einer cDNA-Konzentration von 6ng/µl)
10 µl	RT ² -Real-Time SYBR Green/Fluorescein PCR Master Mix
<u>5µl</u>	Primer (mit einer Konzentration von 5,7 pmol/µl)
20µl	

Folgendes Programm wurde gefahren:

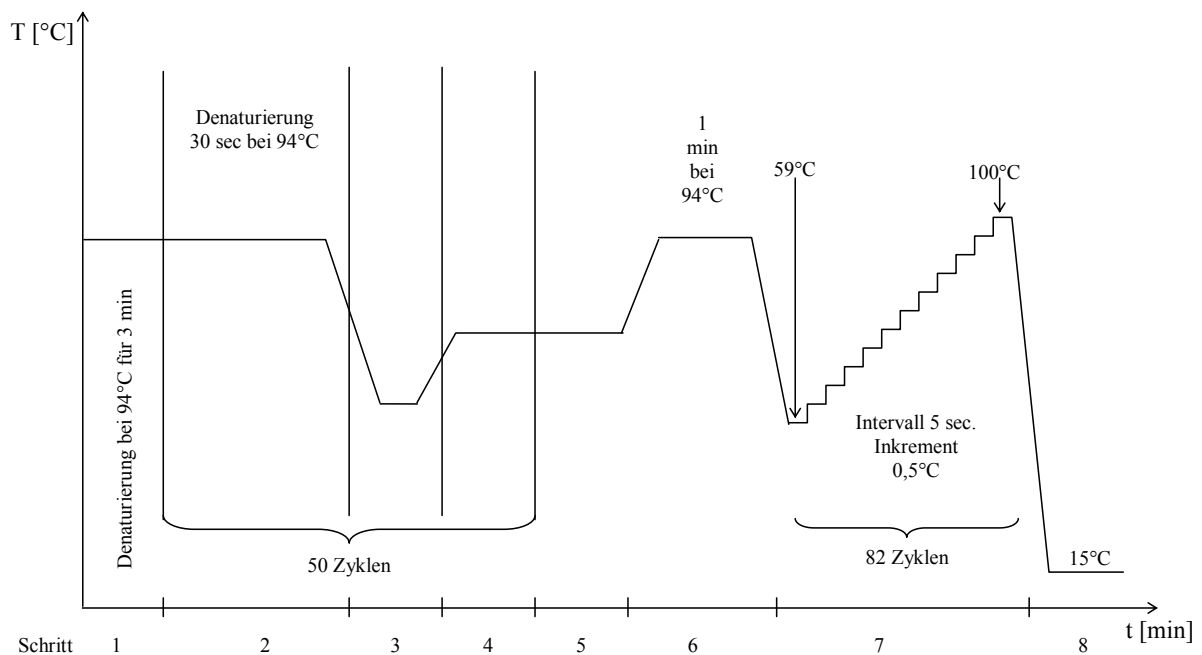


Abb. 4: Real-Time-quantitative-PCR-Schema mit anschließender Schmelzkurvenbestimmung

5.4.9 Auswertung der Real-Time-quantitative-PCR

Die Schmelzkurve (Schritte 5-9 in Abb.4) dient dazu sicherzustellen, dass bei der Real-Time-quantitative-PCR (Schritte 1-5 in Abb.4) ein einziges spezifisches Produkt amplifiziert worden ist.

Die Aufarbeitung der in der RTq-PCR gewonnenen Rohdaten erfolgte zunächst mit dem Programm qBasePlus (Version 1.0 Fa. Biogazelle). Nachfolgend wurde anhand der nun erhaltenen Daten ein Referenzgen für die spätere Normierung und Genregulationsbestimmung gesucht, dies erfolgte mit Hilfe des Applets geNorm (Version 3.5 Ghent University Hospital, Center for Medical Genetics). Bei dieser Berechnung zeigte sich, dass die Kriterien eines Referenzgenes am besten von HPRT1 erfüllt wurden, sodass unter Verwendung dieser Daten als Referenz im Rahmen einer erneuten Berechnung mit dem Programm qBasePlus (Version 1.0 Fa. Biogazelle) eine Ermittlung der Genregulation der einzelnen Gene erfolgen konnte.

5.5 Immunfluoreszenz

5.5.1 Verwendete Antikörper

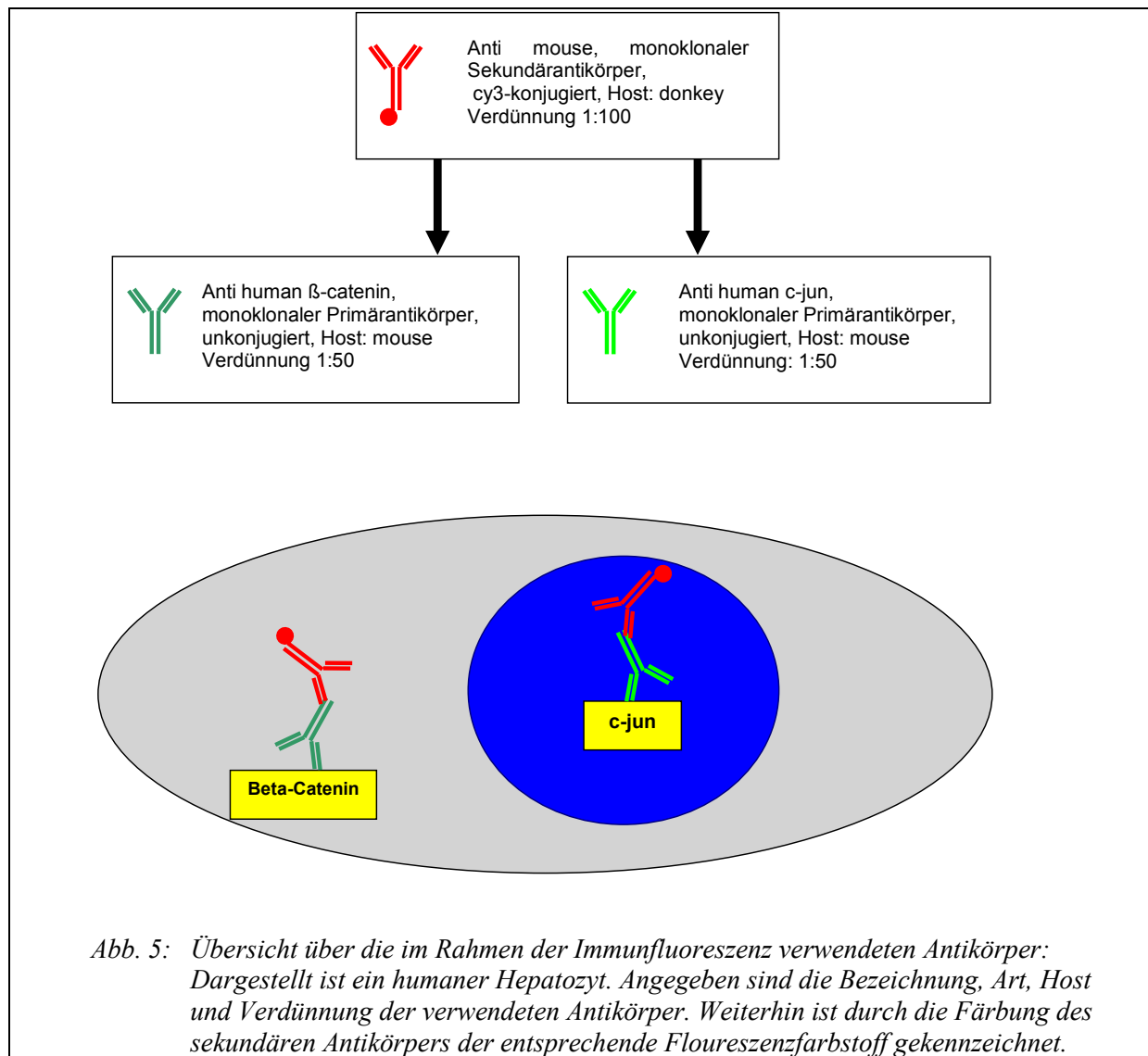
Grundlage der Immunfluoreszenz ist die hochspezifische Avidität von monoklonalen Antikörpern zu den zu untersuchenden Proteinen, die sich in ihrer intrazellulären Quantität in embolisierten versus nicht embolisierten Leberlappen unterscheiden.

Die Markierung der Proteine erfolgte nach dem Prinzip der Doppelfärbung im sogenannten Sandwich-Prinzip. Hierbei bindet in einem ersten Schritt ein gegen das humane Epitop gerichteter primärer Antikörper, welcher dann im zweiten Schritt als Zielstruktur eines mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierten sekundären Immunglobulins dient.

Die exakte Bezeichnung der verwendeten Antikörper ist der folgenden Tabelle 3 zu entnehmen:

<p>Verwendete primäre Antikörper:</p> <ul style="list-style-type: none">-Anti human c-jun, monoklonaler Primärantikörper (KM-1), unkonjugiert, Host: mouse (Santa Cruz biotechnology, Inc.)-Anti human β-catenin, monoklonaler Primärantikörper (12F7), unkonjugiert, Host: mouse (Santa Cruz biotechnology, Inc.)
<p>Verwendete sekundärer Antikörper:</p> <ul style="list-style-type: none">-Anti mouse IgG, monoklonaler Sekundärantikörper, cy3-konjugiert, Host: donkey (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.)

Tab. 3: Immunglobulinschema: Tabellarische Auflistung der eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper, deren Klonalität, Konjugation und Host



5.5.2 Methode der Probenbearbeitung im Rahmen der Immunfluoreszenz

Initial erfolgte die Einbettung der Gewebeprobe in 4% Paraformaldehyd für 24 Stunden, nachfolgend wurden die Proben für 30 Minuten gewässert, um danach in 70% Ethanol gelagert zu werden. Mittels aufsteigender Ethanolreihe wurde das Gewebe vollständig entwässert. Nachfolgend erfolgte die zweimalige Inkubation in flüssigem Paraffin für jeweils eine Stunde.

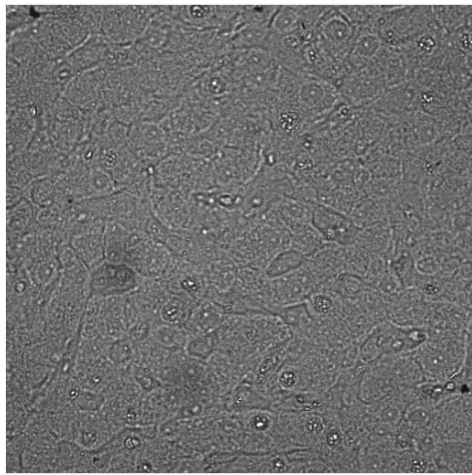
An der Paraffineinbettungsstation wurden die Gewebeproben nun in Blöcke gegossen, um nachfolgend am Mikrotom geschnitten zu werden.

Die Entparaffinierung erfolgte mittels absteigender Alkoholreihe. Nach einem sorgfältigen Waschvorgang (3fach dest. Wasser) wurden die Schnitte demaskiert, indem sie über 20 Min. in TRIS/EDTA in Dampf standen. Im Anschluss wurden die Proben für 15Min. mit Beriglobin und danach mit den primären Antikörpern (Primärer Antikörper mit Antibody Diluent, welches zur Hintergrundreduzierung dient) behandelt. Die Inkubation der primären

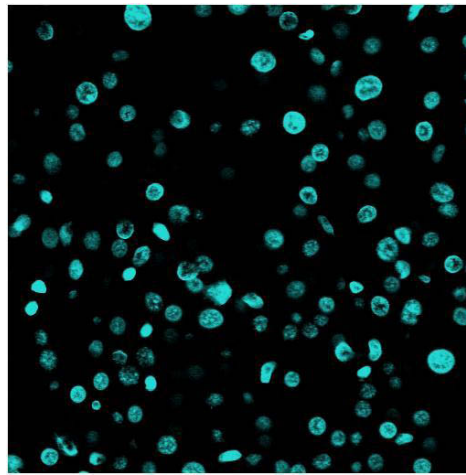
Antikörper erfolgte über Nacht bei 4Grad auf einem Schüttler, um eine gleichmäßige Verteilung der Antikörper zu sichern. Am folgenden Tag erfolgte nach einem weiteren Waschvorgang (3fach dest. Wasser) die Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper. Nach einem erneuten Waschvorgang (3fach dest.Wasser) erfolgte nun die 5minütige Kernfärbung mittels DAPI und weitere Waschvorgänge mit PBS. Danach wurden die Proben mit Mowiol eingedeckt.

Die Auswertung der Färbungen erfolgte mittels Carl-Zeiss Konfokalmikroskop LSM 510meta. Die Visualisierung der Proteine wurde in 400facher Vergrößerung (Plan-Neofluor Objektiv 40mal/0,75) realisiert. Die Lochblenden-Einstellung (pinhole) des LSM wurde bei jeder Auswertung auf 1,00 Airy unit festgelegt.

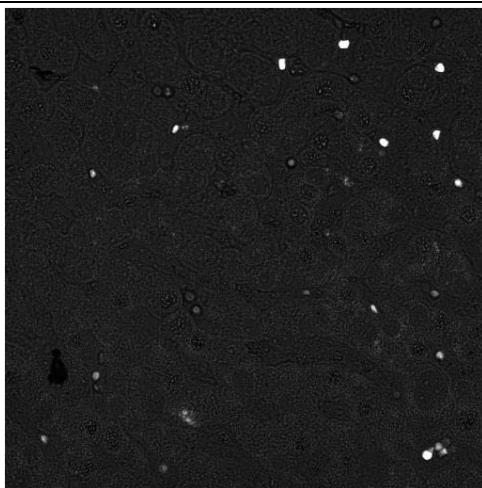
Um unspezifische Fluoreszenzeffekte ausschließen zu können, wurden die Sekundärantikörper auf Kreuzreaktionen untereinander sowie auf Interaktionen mit den Proteinen getestet.



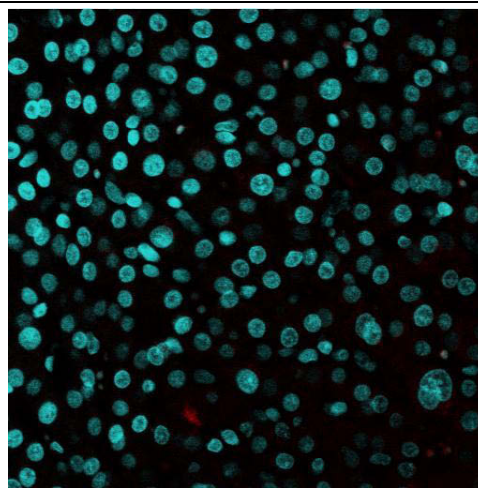
Durchlichtaufnahme



Anti mouse, monoklonaler
Sekundärantikörper,
cy3-konjugiert, Verdünnung 1:100



Durchlichtaufnahme



Anti mouse, monoklonaler
Sekundärantikörper,
cy3-konjugiert, Verdünnung 1:100

Abb. 6: Immunfluoreszenz der genutzten Sekundärantikörper zum Spezifitätsnachweis (400fache Vergrößerung): Abweichend vom beschriebenen Protokoll wurde der Primärantikörper nicht eingesetzt. Aufgrund des Fehlens spezifischer Fluoreszenzmuster können daher unspezifische Kreuzreaktionen der Sekundärantikörper untereinander oder Bindung an intra- oder extrazelluläre Epitope ausgeschlossen werden. Dennoch vorliegende schwache Signale können als minimale physiologische Autofluoreszenz der Zelle angesehen werden. In der Fluoreszenzaufnahme geht von den Zellkernen aufgrund der DAPI-Färbung ein blaues Signal aus.

5.6 Statistik

Die Erfassung und Ordnung der erhobenen Daten wurde mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft) durchgeführt.

Die statistische Auswertung sowie die Berechnung der Signifikanzen der Daten und die Erstellung der Boxplots erfolgte mittels des Programms SPSS (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., an IBM Company Headquarters, 233 S. Wacker Drive, 11th floor Chicago, Illinois 60606) für Windows 11.5.

Um Unterschiede zwischen den Real-Time-quantitative-PCR Daten des embolisierten und nicht embolsierten Leberlappens zu vergleichen und Berechnungen von Signifikanzniveaus ($p < 0,05$) durchzuführen, wurde der gepaarte T-Test herangezogen.

6 Ergebnisse

6.1 Real-Time-quantitative-PCR

Die ausgewählten Beadtypen (n= 46628), welche sich auf jedem Bead Chip befanden, konnten wie in 5.4.4 beschrieben auf 11010 eingeschränkt werden. Mit Hilfe von Entrez Ids konnten nun 10.339 Beadtypen abgebildet werden.

Nun konnten die DEGs (differentially expressed genes), die Unterschiede in der Expression aufwiesen, durch den gepaarten Wilcoxon-Rangsummentest identifiziert werden. Mithilfe des Tests konnte nun abgeschätzt werden, welche Gene im Leberlappen vor Embolisation, aus dem embolisierten Leberlappen nach PAV und aus dem nicht embolisierten Leberlappen nach PAV hoch- oder runterreguliert waren.

Im Detail zeigten die Analysen, dass 218 Gene zwischen dem Leberlappen vor Embolisation und dem embolisierten Leberlappen hochreguliert und 295 Gene runterreguliert waren.

Zwischen dem Leberlappen vor Embolisation und dem nicht embolisierten Leberlappen konnte festgestellt werden, dass 104 Gene hoch- und 259 Gene runterreguliert wurden.

Von größtem Interesse war der Unterschied zwischen dem embolisierten und dem nicht embolisierten Leberlappen. Die Analysen zeigten, dass 6 Gene hoch- und 36 Gene herunterreguliert waren.

Um genauere Kenntnisse über die funktionellen Zusammenhänge zu verstehen, wurde mithilfe des „DAVID bioinformatics resources tools“ (the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) eine Analyse erstellt. Hierbei wurden die unter (http://david.abcc.ncifcrf.gov/helps/knowledgebase/DAVID_coverage.jpg) aufgeführten Datenbanken von DAVID als Wissensgrundlage für die Überprüfung einer signifikanten Anreicherung von Komponenten bestimmter Stoffwechsel- und Signalwege angewandt.

Anhand der Auswertung der Daten aus der Bead Array-Technologie konnten die zu interessierenden Zielgene für die Real-Time-quantitative-PCR sowohl wissens- als auch datenbasiert ausgewählt werden.

Aus den Transkripten wurden 29 Gene herausgesucht, welche mittels der PCR genauer untersucht wurden.

Um die Höhe der Synthese von spezifischer mRNA in den embolisierten und nicht embolisierten Leberlappen zu bestimmen, wurde die RTq-PCR durchgeführt. Alle Werte wurden dann auf die getrennt erhobene Expression des Housekeeping-Gens HPRT-

bezogen, indem die Differenz auf den Ct-Werte des Housekeeping-Gens und denen des zu untersuchenden Gens gebildet wurde.

Daraus ergaben sich absolute Unterschiede zwischen den beiden Genen. Es wurde die Darstellungsweise $2^{-\Delta Ct(\text{zu untersuchendes Gen})}$ gewählt, um die Unterschiede in der Genexpression in den verschiedenen Leberproben besser illustrieren zu können.

Nachfolgend werden die Ergebnisse zu acht ausgewählten Genen gezeigt, bei deren Untersuchungen in besonderem Maße signifikante Ergebnisse im Vergleich der Leberbiopate des embolisierten und des nicht embolisierten Leberlappens gefunden werden konnten.

Bei der Untersuchung der übrigen Gene konnten ebenfalls teilweise deutliche Tendenzen im Sinne einer veränderten Genexpression aufgezeigt werden. Diese Ergebnisse erreichten aber bisweilen nicht das geforderte Signifikanzniveau von $p < 0.05$. Auf eine detaillierte Darstellung dieser Resultate wird daher nachfolgend verzichtet. Die Ergebnisse der nicht signifikanten Gene werden nachfolgend in der Tabelle dargestellt. Wobei der Mittelwert, die Standardabweichung und die p-Werte der delta Ct-Werte berücksichtigt wurden.

Gen	Proben	Mittelwert	Standardabweichung	A vs. B	A vs. C	B vs. C
ADCY 3	A	0,034	0,0304	0,801	0,420	0,332
	B	0,037	0,027			
	C	0,027	0,014			
AIFM1	A	13,494	11,825	0,065	0,126	0,093
	B	3,147	2,196			
	C	4,900	1,921			
COX15	A	0,489	0,554	0,102	0,190	0,419
	B	0,111	0,063			
	C	0,166	0,168			
DENND2A	A	0,215	0,322	0,614	0,331	0,411
	B	0,129	0,146			
	C	0,099	0,0531			
EDN1	A	0,175	0,127	0,808	0,223	0,280
	B	0,137	0,134			
	C	0,100	0,071			
EDNRA	A	0,173	0,124	0,812	0,212	0,276
	B	0,123	0,131			
	C	0,092	0,067			
EGR1	A	8,144	8,886	0,581	0,435	0,476
	B	5,205	4,163			
	C	6,264	4,529			

ELMO1	A	0,5489	0,396	0,076	0,068	0,513
	B	0,210	0,105			
	C	0,238	0,096			
GALC	A	0,584	0,283	0,109	0,139	0,360
	B	0,344	0,211			
	C	0,382	0,186			
ICAM1	A	2,685	2,451	0,366	0,603	0,207
	B	1,539	1,036			
	C	3,254	4,068			
IGFBP1	A	14,131	14,470	0,019	0,027	0,172
	B	57,064	37,802			
	C	78,601	54,241			
IL8	A	0,140	0,125	0,308	0,110	0,864
	B	0,327	0,566			
	C	0,295	0,343			
NOTCH4	A	0,139	0,157	0,115	0,080	0,532
	B	0,035	0,023			
	C	0,028	0,028			
PLCB	A	0,024	0,051	0,403	0,367	0,336
	B	0,188	0,590			
	C	0,487	1,520			
PUM1	A	1,388	1,164	0,069	0,054	0,777
	B	0,450	0,291			
	C	0,420	0,144			
RHOB	A	1,055	0,313	0,021	0,018	0,146
	B	3,617	2,106			
	C	5,520	3,587			
STAT4	A	1,026	0,211	0,019	0,017	0,212
	B	2,252	0,996			
	C	2,955	1,455			
TGFB2	A	0,531	0,489	0,321	0,635	0,715
	B	0,718	0,676			
	C	0,648	0,423			
TGFB3	A	0,412	0,437	0,552	0,833	0,365
	B	0,295	0,144			
	C	0,443	0,474			
VEGFA	A	6,259	5,720	0,043	0,030	0,344
	B	0,779	0,388			
	C	0,999	0,535			
WNT5B	A	0,040	0,039	0,217	0,173	0,837
	B	0,020	0,014			
	C	0,019	0,014			

Tab. 4: Darstellung der Mittelwerte, der Standardabweichung und der p-Werte der delta Ct-Werte der Proben. A=Probe vor Embolisation, B=Probe aus dem embolisierten Leberlappen, C=Probe aus dem nicht embolisierten Leberlappen

6.1.1 Activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 2 (AHSA2)

Abb. 7 zeigt die Unterschiede in der Genexpression in den Proben des Leberlappens vor Embolisation, in den Proben des embolisierten Leberlappens und in denen des nicht embolisierten Leberlappens. Es ist ein signifikanter Unterschied zwischen dem embolisierten Leberlappen und dem nicht embolisierten Leberlappen zu erkennen ($p < 0.016$, gepaarter t-test).

Es zeigt sich eine deutliche Expressionssteigerung des Proteins AHSA2 im nicht embolisierten Lappen im Vergleich mit dem embolisierten Leberlappen.

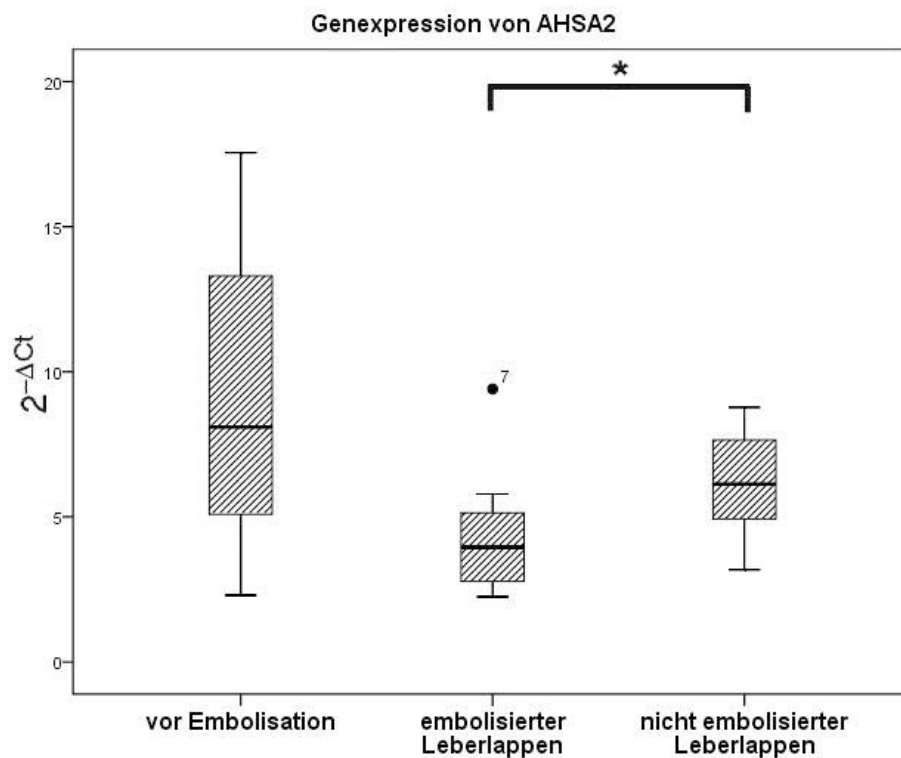


Abb. 7: Expression von AHSA2 in den Hepatozyten vor Embolisation (n=8) im embolisierten Leberlappen (n=10) und im nicht embolisierten Leberlappen (n=10), [$ p < 0.05$]*

6.1.2 ATPase, H⁺ transporting V0 subunit e2 (ATP6V0E2)

In folgender Abb. 8 wird die unterschiedliche Expression des Proteins ATP6V0E2 vor Embolisation, im embolisierten Leberlappen und im nicht embolisierten Leberlappen gezeigt. Eine deutliche Expressionsminderung ($p < 0.001$) ist im embolisierten Leberlappen im Vergleich zum Ausgangsbefund erkennbar. Weiterhin zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0.043$) zwischen dem Leberlappen vor Embolisation und dem nicht embolisierten Leberlappen.

Von größtem Interesse ist jedoch auch hier der signifikante Expressionsunterschied ($p < 0.040$) zwischen dem embolisierten und dem nicht embolisierten Leberlappen. Im Vergleich ist eine deutlich gesteigerte Genexpression im nicht embolisierten Lappen erkennbar.

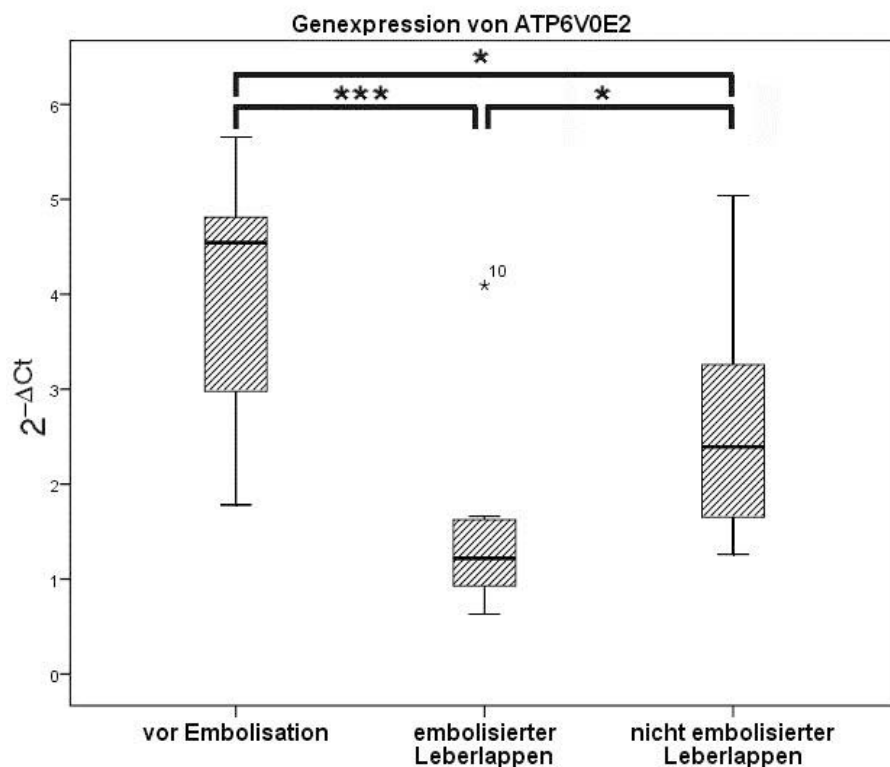


Abb. 8: Höhe der Expression des Proteins ATP6V0E2 vor der Embolisation ($n=8$), im embolisierten Leberlappen ($n=10$) und im nicht embolisierten Leberlappen ($n=10$), [$* p < 0.05$; $*** p < 0.001$]

6.1.3 Enolase 3 (ENO3)

Abb. 9 stellt das Expressionsniveau des Proteins ENO3 in dem Leberlappen vor Embolisation, im embolisierten Leberlappen und im nicht embolisierten Leberlappen dar. Es sind signifikante Expressionsunterschieden zwischen den Proben des embolisierten und des nicht embolisierten Leberlappens zu erkennen.

Der nicht embolisierte Leberlappen zeigt ein Expressionsteigerung im direkten Vergleich mit dem embolisierten Leberlappen.

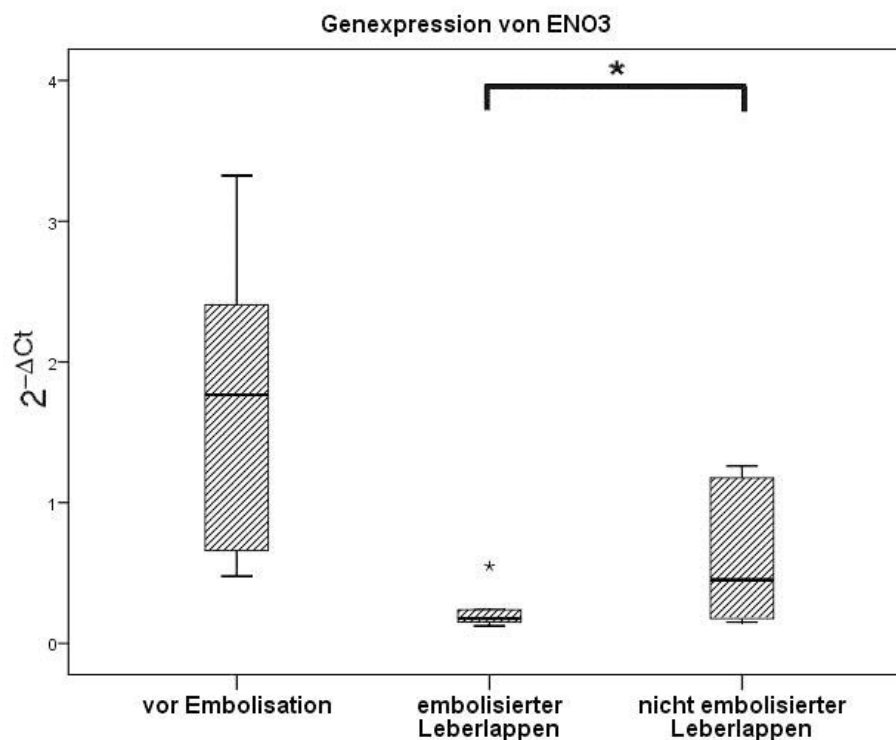


Abb. 9: Höhe der Expression des Proteins ENO3 vor der Embolisation (n=8), im embolisierten Leberlappen (n=10) und im nicht embolisierten Leberlappen (n=10), [^{*} p<0.05]

6.1.4 Elektron-transfer-flavoprotein beta polypeptide (ETFB)

In der folgenden Abb. 10 wird die Expression des Proteins ETFB dargestellt.

Es kann ein signifikanter Unterschied ($p < 0.005$) zwischen den Proben vor der Embolisation und den Proben des embolisierten Leberlappens gezeigt werden.

Von besonderem Interesse ist die Signifikanz ($p < 0.046$) zwischen dem embolisierten und dem nicht embolisierten Leberlappen. Es wird eine Expressionssteigerung des Proteins ETFB im nicht embolisierten Leberlappen im Vergleich zum embolisierten Leberlappen sichtbar.

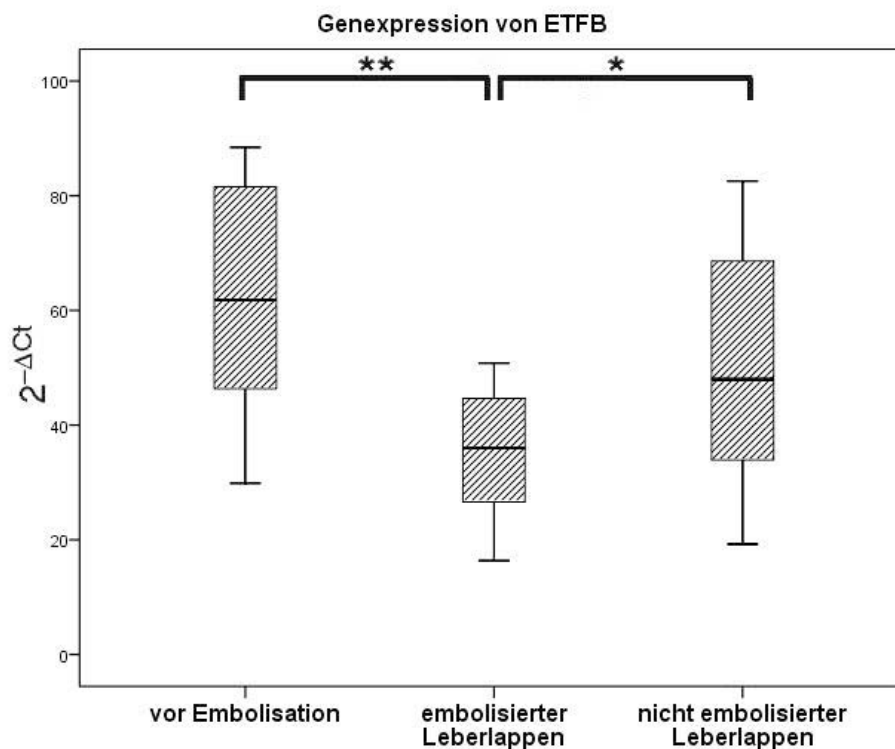


Abb. 10: Höhe der Expression des Proteins ENO3 vor der Embolisation ($n=8$), im embolisierten Leberlappen ($n=10$) und im nicht embolisierten Leberlappen ($n=10$), [$* p < 0.05$; $** p < 0.01$]

6.1.5 Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase (HADH)

In der Abb. 11 wurden die Expressionsunterschiede des Proteins HADH vergleichend zwischen dem Leberlappen vor Expression, im embolisierten Lappen und im nicht embolisierten Leberlappen dargestellt.

Es ist ein signifikanter Unterschied ($p < 0.007$) zwischen den Proben des Leberlappens vor Embolisation und den Proben des embolisierten Lappens erkennbar.

Weiterhin ist das Expressionsniveau des nicht embolisierten Leberlappens signifikant ($p < 0.004$) gegenüber des embolisierten Lappens gesteigert.

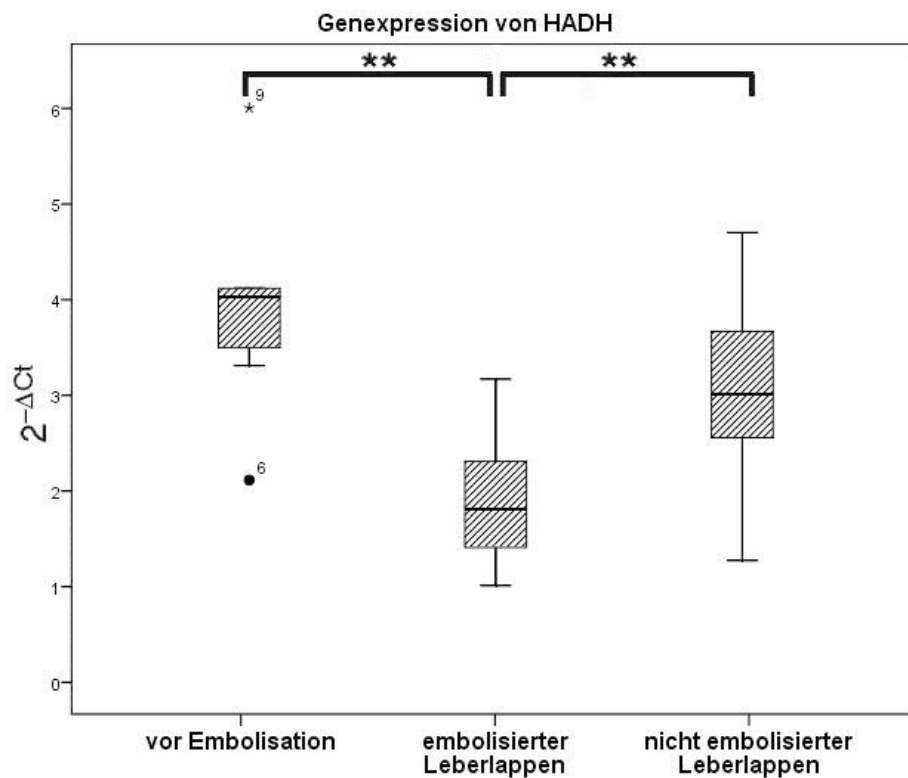


Abb. 11: Höhe der Expression des Proteins HADH vor der Embolisation ($n=8$) im embolisierten Leberlappen ($n=10$) und im nicht embolisierten Leberlappen ($n=10$); [$** p < 0.01$]

6.1.6 Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)

In der Abb. 12 wird der Expressionsunterschied des Proteins IGFBP2 vor der Embolisation, im embolisierten und nicht embolisierten Leberlappen gezeigt.

Es ist ein signifikanter Unterschied ($p < 0.011$) zwischen dem embolisierten und dem nicht embolisierten Leberlappen erkennbar.

Das Expressionsniveau ist im nicht embolisierten Leberlappen im Vergleich zum embolisierten Lappen deutlich erhöht.

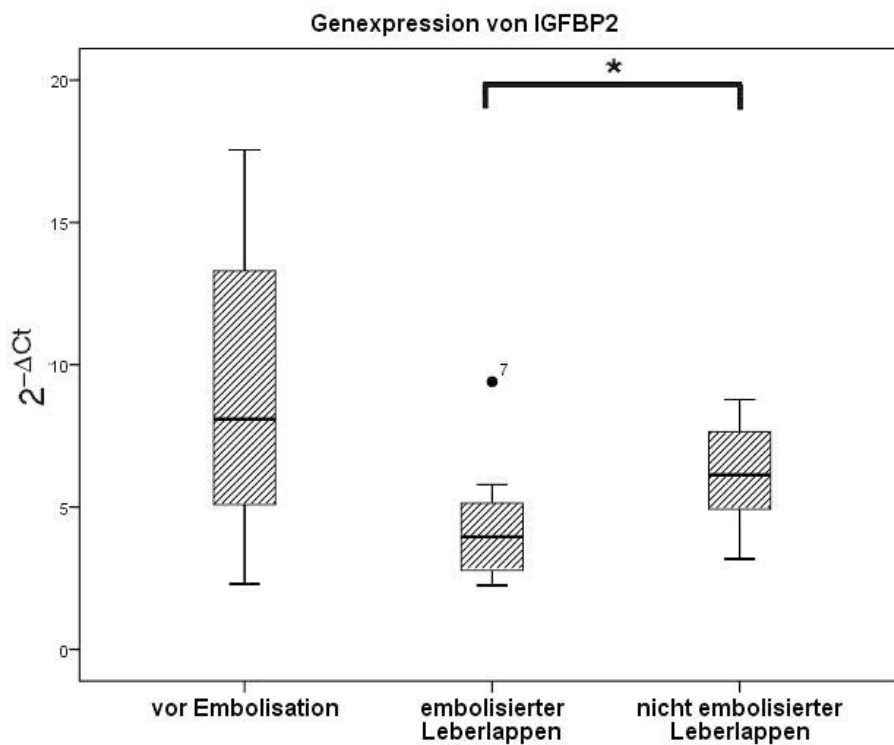


Abb. 12: Höhe der Expression des Proteins IGFBP2 vor der Embolisation ($n=8$), im embolisierten Leberlappen ($n=10$) und im nicht embolisierten Leberlappen ($n=10$), [$* p < 0.05$]

6.1.7 Interleukin 1, beta (IL1B)

Nachfolgend wird die Expression des Proteins IL1B in den unterschiedlichen Proben vor Embolisation, im embolisierten Leberlappen und im nicht embolisierten Lappen dargestellt. Es ist eine Signifikanz ($p < 0.05$) zwischen den Proben vor Embolisation und dem nicht embolisierten Leberlappen zu erkennen.

Von großem Interesse ist der signifikante Expressionsunterschied ($p < 0.05$) zwischen dem embolisierten und dem nicht embolisierten Proben des Leberlappen, wobei eine Expressionssteigerung im nicht embolisierten Lappen zu erkennen ist.

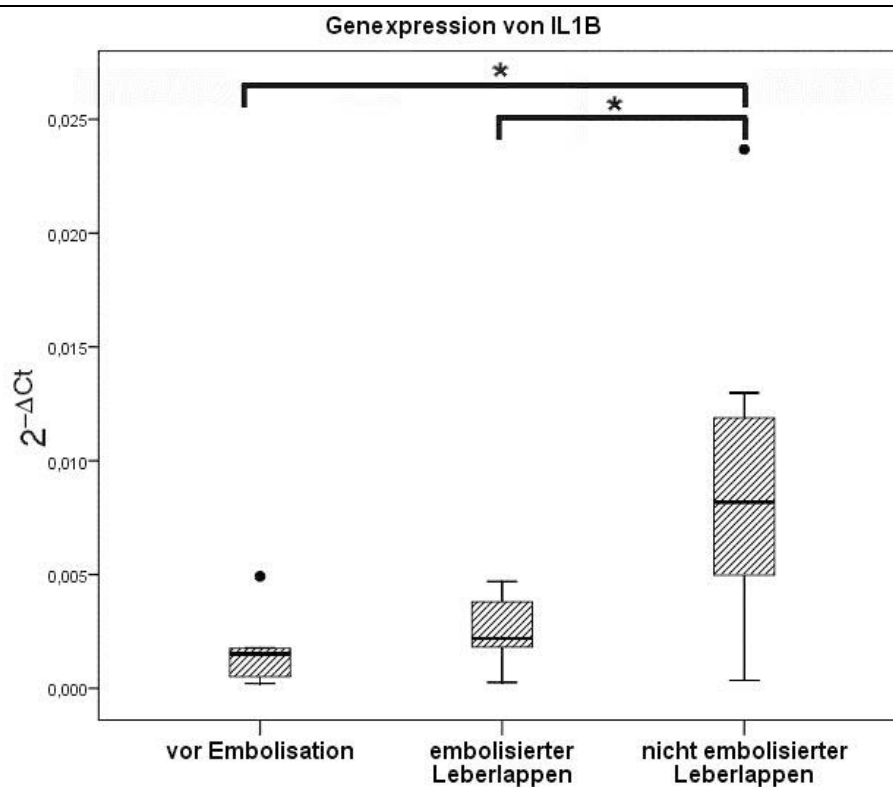


Abb.13: Höhe der Expression des Proteins IL1B vor der Embolisation ($n=8$), im embolisierten Leberlappen ($n=10$) und im nicht embolisierten Leberlappen ($n=10$), [$* p < 0.05$]

6.1.8 Proteasome activator subunit 2 (PSME2)

In Abb. 14 sind die Unterschiede in der Expression des Proteins PSME2 zwischen den unterschiedlichen Proben aufgezeigt.

Es ist ein signifikanter Unterschied ($p < 0.016$) zwischen dem embolisierten Leberlappen und dem nicht embolisierten Lappen zu erkennen. Das Expressionsniveau im nicht embolisierten Leberlappen ist im Vergleich zum nicht embolisierten Lappen gesteigert.

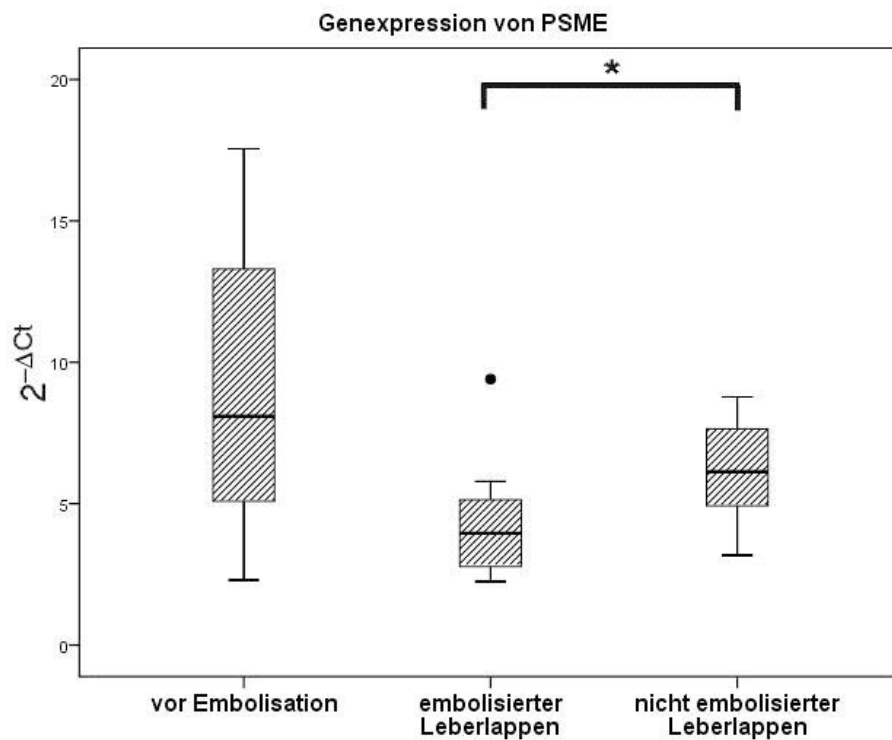


Abb. 14: *Höhe der Expression des Proteins PSME2 vor der Embolisation (n=8), im embolisierten Leberlappen (n=10) und im nicht embolisierten Leberlappen (n=10), [$p < 0.05$]*

6.2 Immunhistochemie

Es wurde die Proteinsynthese in embolisierten und nicht embolisierten Leberproben von zehn Patienten gemessen. Nach durchschnittlich 40 Tagen (34-55 Tagen) wurde sowohl eine Probe aus dem embolisierten Leberlappen als auch aus dem nicht embolisierten Lappen entnommen. Nach immunhistochemischer Färbung wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop die Expression der Proteine beta-catenin und c-Jun untersucht.

6.2.1 Qualitative immunhistochemische Ergebnisse

6.2.1.1 Expression von beta-catenin in embolisierten und nicht embolisierten Leberproben

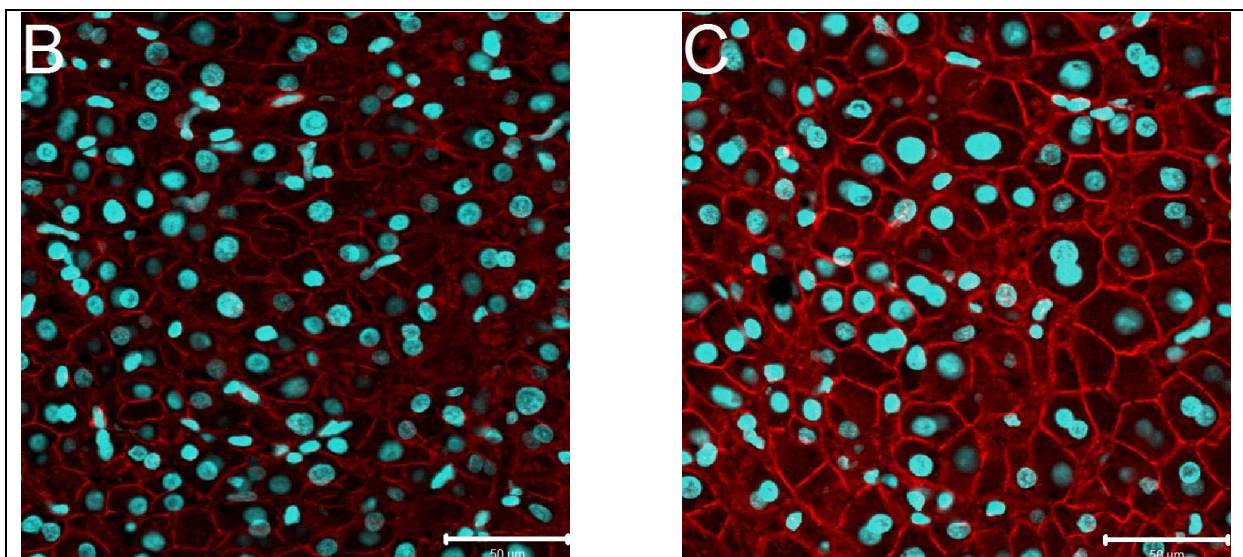


Abb. 15: Expression von beta-catenin im embolisierten Leberlappen (B) und im nicht-embolisierten Leberlappen (C) aufgenommen mit einer 40fachen Objektivvergrößerung. Die Schnittdicke beträgt 6 Mikrometer. Färbung der Zellkerne mittels DAPI (blau) und des Zielproteins beta-catenin (rot) durch einen monoklonalen primären Antikörper, welcher sich gegen beta-catenin richtet und einen monoklonalen sekundären Antikörper, der an den Farbstoff Cy3 gebunden ist.

Es ist eine deutliche Expression von beta-catenin in der Zellmembran und im Zytoplasma zu erkennen. Der Expressionsgrad weist an beiden Leberproben große Unterschiede auf. Im nicht embolisierten Leberlappen ist im Gegensatz zum embolisierten Lappen eine deutlich gesteigerte Expression erkennbar.

6.2.1.2 Expression von c-jun im embolisierten und nicht embolisierten Leberproben

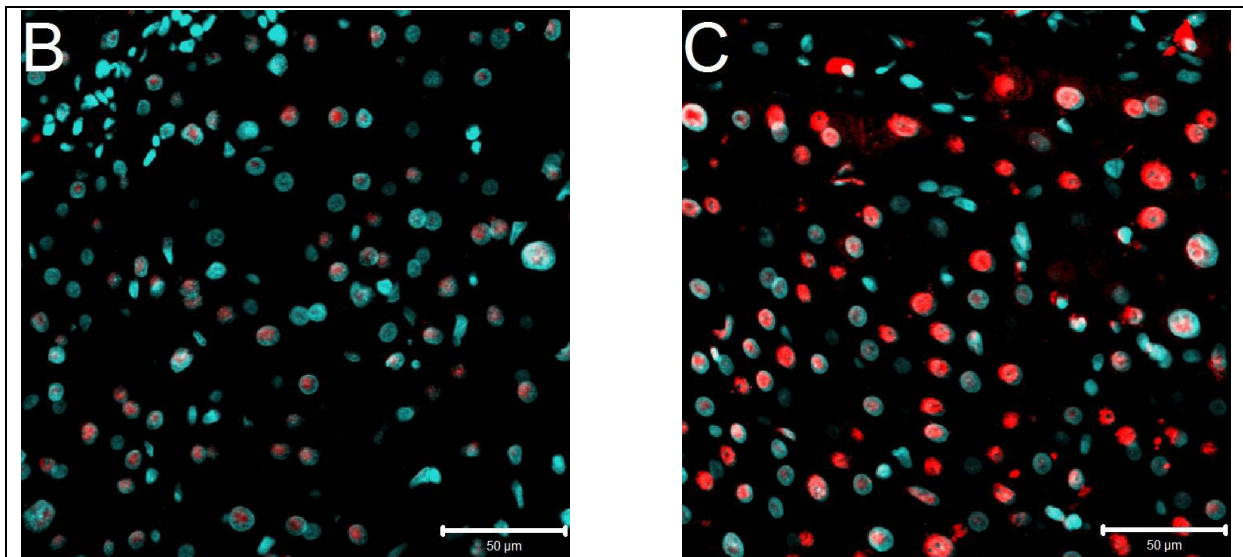


Abb. 16: *c-jun Expression im embolisierten Leberlappen (B) und im Vergleich dazu im nicht embolisierten Leberlappen (C) aufgenommen mit einer 40fachen Objektivvergrößerung. Die Schnittdicke beträgt 6µm. Färbung der Zellkerne mittels DAPI (blau) und des Zielproteins c-jun (rot) durch einen monoklonalen primären Antikörper, welcher sich gegen c-jun richtet und einen monoklonalen sekundären Antikörper, der an den Farbstoff Cy3 gebunden ist.*

Das Expressionsmuster deutet auf eine gesteigerte Anreicherung des Proteins c-jun im Bereich der Zellkerne hin. Es sind deutliche Unterschiede im Hinblick auf den Expressionsgrad zu erkennen. Im nicht.embolisierten Leberlappen ist im Gegensatz zum embolisierten Lappen eine vermehrte Speicherung des Proteins c-jun zu erkennen.

7 Diskussion

Die Leberregeneration ist ein komplexer Vorgang, welcher ein präzises Zusammenspiel von unterschiedlichen Zelltypen und molekularen Prozessen verlangt. Die exakten Mechanismen sind jedoch noch weitgehend unklar. Die Auswahl der Kandidaten für die PCR war sowohl wissens- als auch datenbasiert. Mithilfe der Bead-Array-Technologie konnte die 29 Zielgene ermittelt werden (siehe 6.1).

7.1 Objektive Wertung der Methodik

Die Genexpressionsanalyse wurde mit Hilfe unterschiedlicher Verfahren durchgeführt. Bei der Interpretation der Ergebnisse müssen einige Aspekte berücksichtigt werden, um die Ergebnisse besser einschätzen zu können

Im Rahmen der Microarray Analyse sollte der Umstand Beachtung finden, dass dieses Verfahren den Stellenwert einer Screeningmethode besitzt, da eine Vielzahl falsch-positiver sowie falsch-negativer Ergebnisse auftritt. Somit können Unterschiede in der Genexpression aufgezeigt werden, obgleich keinerlei Veränderungen ebendieser zu verzeichnen sind.

Die Real-Time-quantitative-PCR hingegen besitzt eine höhere Genauigkeit und ein niedrigeres Detektionslimit als die Mikroarray Analyse. Deshalb schien es uns sinnvoll, Gene, die einen Unterschied in der Mikroarray Analyse aufwiesen, genauer mit Hilfe der Real-Time-quantitative-PCR zu untersuchen. Dieses Vorgehen wird in den MIAME Kriterien in Bezug auf (prä-)analytisches Qualitätskontrollmanagement empfohlen (Brazma et al. 2001).

Jedoch sind auch hier Expressionsunterschiede nur bis zu einem gewissen Maß erfassbar. Während große Unterschiede problemlos gemessen werden können, lassen sich kleine Unterschiede nur schwer erkennen und sollten demnach kritisch betrachtet werden.

Weiterhin sollte bei Genanalysen immer berücksichtigt werden, dass davon ausgegangen wird, dass eine erhöhte mRNA Expression in vergleichbarem Maße auch mit einer Erhöhung der Proteinexpression einhergeht. Jedoch können posttranskriptionale und posttranslatorische Prozesse dazu führen, dass dies nicht zutrifft.

Der Einsatz des Carl Zeiss Laser Scanning Microskops ermöglicht eine simultane Darstellung mehrerer Strukturen mit unterschiedlich fluoreszierenden Konjugaten. Durch einen Spezifitätsnachweis konnten Interaktionen zwischen Antikörpern und Hepatozyten sowie Kreuzreaktionen der Antikörper weitgehend ausgeschlossen werden.

Dennoch können mit Hilfe der Immunfluoreszenz keine quantitativen Aussagen über die Expression der Proteine getroffen werden.

7.2 Diskussion der Ergebnisse

7.2.1 Die Rolle von beta-catenin und c-jun auf die Regeneration der Leber

Im Folgenden soll die Verteilung der Proteinsynthese im embolisierten und nicht embolisierten Leberlappen anhand der Immunhistochemie gezeigt werden. Wobei hier berücksichtigt werden muss, dass die Auswertung nur anhand der bildlichen Darstellung erfolgt ist und somit keine Aussagen über einen quantitativen Wert erfolgen kann.

Beta-catenin ist ein integraler Bestandteil des Wnt-Signalweges. Mitunter vermag es die Funktion eines Onkogens einzunehmen. In früheren Studien konnte der Einfluss von beta-Catenin auf eine Vielzahl von biologischen Vorgängen in der Leber, wie zum Beispiel Entwicklung der Leber, Regeneration nach erweiterter Hemihepatektomie und Pathologie der Entstehung des HCC beschrieben werden (Thompson und Monga 2007).

Es wird vermutet, dass beta-Catenin eine wichtige Funktion in der frühen Regeneration nach erweiterter Hemihepatektomie einnimmt und die Kaskade für eine erfolgreiche Leberregeneration initiiert. Viele Studien beschäftigen sich mit der zwei/drittel Hepatektomie an Ratten. Schon nach kürzester Zeit nach der Hepatektomie konnte ein Anstieg von beta-Catenin beobachtet werden. Es wird vermutet, dass sowohl epigenetische als auch post-translatorische Mechanismen hierbei eine Rolle spielen (Monga et al. 2001).

Beta-Catenin scheint einen großen Einfluss auf viele Faktoren der Leberregeneration zu haben. Es ist bekannt, dass die Zelladhäsion während der Leberregeneration abnimmt. So wird vermutet, dass der starke Anstieg des beta-Catenins direkt den Abfall von E-Cadherin bedingt (Monga et al. 2001). Der Verlust des Kontakts der Hepatozyten untereinander ist ein wichtiger Bestandteil der Leberregeneration und Rekonstruktion der Zellen, um die Leber in ihre Funktion zurückzuführen (Monga et al. 2001).

In bisherigen Studien wurde beschrieben, dass der Anstieg des beta-Catenins weniger als 15 Minuten andauert, jedoch eine Translokation im Kern auch noch nach 48 Stunden gefunden werden kann.

In unseren Ergebnissen der Immunfluoreszenz zeigt sich eine klare Expressionssteigerung in dem nicht embolisierten Leberlappen im Gegensatz zum embolisierten Leberlappen. Es kann als überraschend angesehen werden, dass sich nach im Schnitt 40 Tage eine so starke Veränderung gezeigt hat, sodass anzunehmen ist, dass die Expressionssteigerung von beta-catenin länger anhält, als bisher vermutet wurde.

C-jun ist ein Gen, welches gemeinsam mit c-fos die AP-1 Antwort (Activator protein 1) steuert (Brenner 1998). Die AP-1 Antwort reguliert die Expression von Genen, wenn sie durch bestimmte Stimuli wie z.B. Zytokine, Wachstumsfaktoren, Stress oder bakterielle und virale Infektion, aktiviert wird. Weiterhin ist sie für zelluläre Mechanismen verantwortlich, welche für die Differenzierung, Proliferation als auch für die Apoptose eine wichtige Rolle spielen.

In Lebermalignomen scheint c-jun die Apoptose in einem p53 abhängigen Mechanismus zu hemmen (Eferl et al. 2003).

In einer Studie wurde gezeigt, dass c-jun/AP-1 die Regeneration über einen molekularen Signalweg, in welchen p53, p21 und p38 involviert sind, in der Leber reguliert. Der c-jun/AP-1 Signalweg kann die Proliferation der Hepatozyten kontrollieren, indem es p53, p21 und p38 supprimiert und sogar zu einer Progression des arrestierten Zellzyklus am Übergang von der G2- zur M-Phase führt (Shaulian und Karin 2001). Im Gegensatz dazu konnte in Abwesenheit von c-jun ein Zellzyklusarrest, initiiert durch p53, sogar nach erweiterter Hemihepatektomie festgestellt werden. Damit kann gezeigt werden, dass c-jun in der Lage ist, die Proliferation zu beschleunigen, indem es bestimmte Kontrollpunkte überwinden kann.

Dieser Signalweg übernimmt eine wichtige Rolle in dem Erholungsprozess der Leber, welcher bei erweiterter Hemihepatektomie und bei Leberverletzungen folgt (Stepniak et al. 2006).

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz zeigen eine deutlich gesteigert Expression von c-jun im nicht embolisierten im Vergleich zum embolisierten Leberlappen. Dieses verdeutlicht, dass auch 40 Tage nach der PAE die Expression von c-jun noch immer erhöht ist und lässt auf eine wichtige Funktion dieses Gens bei der Regeneration der Leber schließen.

In Studien konnte bisher nur gezeigt werden, dass beta-catenin und c-jun eine wichtige Funktion in der frühen Regeneration bei Pfortaderembolisation einnehmen. Unsere Ergebnisse lassen jedoch darauf schließen, dass sie auch 40Tage nach der Embolisation noch immer einen Einfluss auf die Proliferation haben.

7.2.2 Die Rolles des Insulin like growth factor Bindungsprotein 2 im Rahmen der Leberregeneration

Der Insulin like growth factor (IGF-1, IGF-2) und deren zytoplasmatisch, membranäre und extrazelluläre gelegene Bindungs-Proteine (IGFBP-1, IGFBP-2) sowie deren Rezeptoren (Typ 1- und 2-IGF-Rezeptor) bilden ein endokrines, autokrines und parakrines System, welches Wachstum, Differenzierung und/oder Apoptose generiert (Simmen et al. 1998).

IGFBP2 ist ein ca. 36 kDa großes Protein, welches vor allem während der Fetalperiode und beim Erwachsenen in der Leber, im Fettgewebe, im reproduktiven und im zentralnervösen System synthetisiert wird (Shimasaki und Ling 1991). IGFBP2 scheint besonders in der Biologie von Tumorerkrankungen eine Rolle zu spielen, denn bei vielen Tumorarten konnte bei Patienten ein erhöhter IGFBP2 Pegel festgestellt werden (Lee et al. 1999, Elmlinger et al. 2001, Ranke et al. 2003). Weiterhin war in den meisten Fällen eine Remission des Tumors auch von einem Rückgang des IGFBP2 begleitet.

IGFBP2 kann sowohl einen inhibierenden als auch einen aktivierenden Effekt auf die IGF-Signalkaskade haben (Tang et al. 2005) (Hu et al. 2007). Welchen Effekt es auslöst, scheint daran zu liegen, ob es frei oder gebunden an die extrazelluläre Matrix vorliegt (Wheatcroft und Kearney 2009).

Durch die Ergebnisse der Real-Time-quantitative-PCR konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Expression des embolisierten Leberlappens und des nicht embolisierten Lappens festgestellt werden. IGFBP2 zeigt eine deutlich erhöhte Expression im nicht embolisierten Lappen. Die Meinung über die Funktion des IGFBP2 ist kontrovers. Es wird sowohl eine inhibierende als auch eine aktivierende Funktion auf den IGF-Singalweg und somit auf die Prolifertion von Zellen diskutiert. Die Ergebnisse der RTq-PCR in unserer Untersuchung unterstützen die Hypothese einer proliferativen Fuktion dieses Proteins, da insbesondere im embolisierten Leberlappen eine Steigerung der Genexpression zu verzeichnen war.

7.2.3 Erstellen eines Modells

Anhand der Ergebnisse der Daten der Immunfluoreszenz und der RTq-PCR konnten wir ein neues Modell über die molekulare Regulation nach Pfortaderembolisation erstellen.

Die äußeren Ellipsen sollen jeweils die Zelle und die inneren jeweils den Zellkern symbolisieren. Dabei sind die hochregulierten Transkripte (Pfeil nach oben) im Vergleich zu den Proben vor der Embolisation im Kern eingetragen.

Das Modell zeigt sowohl die proliferativen Faktoren (oben im Bild) als auch die apoptosefördernde Faktoren (unten im Bild), die mit einer PAE einhergehen.

In unserem Modell können wir durch die erzielten Ergebnisse zeigen, dass IGFBP2 gemeinsam mit TGFBR2 und 3 den IGF-Signalweg reguliert. Dieser besitzt eine zentrale Funktion in der Regulation von Zellwachstum und Proliferation durch die Aktivierung der Transkription von Genen, die für die Kontrolle und den Ablauf des Zellzyklus von großer Bedeutung sind. Jedoch ist IGFBP2 stärker auf der nicht-embolisierten Seite (Basis des Dreiecks) und TGFBR2/3 auf der embolisierten Seite (Basis des Dreiecks) exprimiert, welches den wesentlichen Unterschied für die Interaktionen darstellen könnte.

Das IGF-1 Signal scheint dagegen gleichmäßig auf beiden Seiten zu wirken (Rechteck).

Es ist bekannt, dass über den IGF-Signalweg die Transkriptionsfaktoren ELK, SRF und AP-1, welche über viele weitere Faktoren promotogene Signale in die Zelle leiten, aktiviert werden. Weiterhin kann das Gen c-jun über den AP-1-Signalweg reguliert werden, welches für die Proliferation der Hepatozyten sorgt.

Unser Model zeigt, dass sowohl beta-catenin als auch c-jun über den AP-1 und HMGB1 eine wichtige Funktion in der Proliferation übernehmen.

Der quantitative Vergleich für beta-catenin und c-jun ist im Plasma eingetragen (schwächer auf der embolisierten Seite der Pfeil zeigt nach unten; als für die nicht embolisierte Seite Pfeil zeigt nach oben). Das HMGB1 und AP-1 Signal sind stärker auf der nicht embolisierten Seite zu beobachten und scheint die koordinierte Proliferation voranzutreiben.

Weiterhin konnten wir Unterschiede der Glykoproteine THBS1 und ENO3 finden, welche Interaktionen zwischen den Zellen untereinander und zwischen Zellen und Matrix kontrollieren.

In unserem Modell nehmen für die Apoptose die Gene, IL1b, BCL2 und CASP8 eine wichtige Rolle ein.

Weiterhin ist eine wichtige Erkenntnis, dass man Proliferation auf beiden Seiten beobachten kann, jedoch eine vermehrte Apoptose auf der embolisierten Seite.

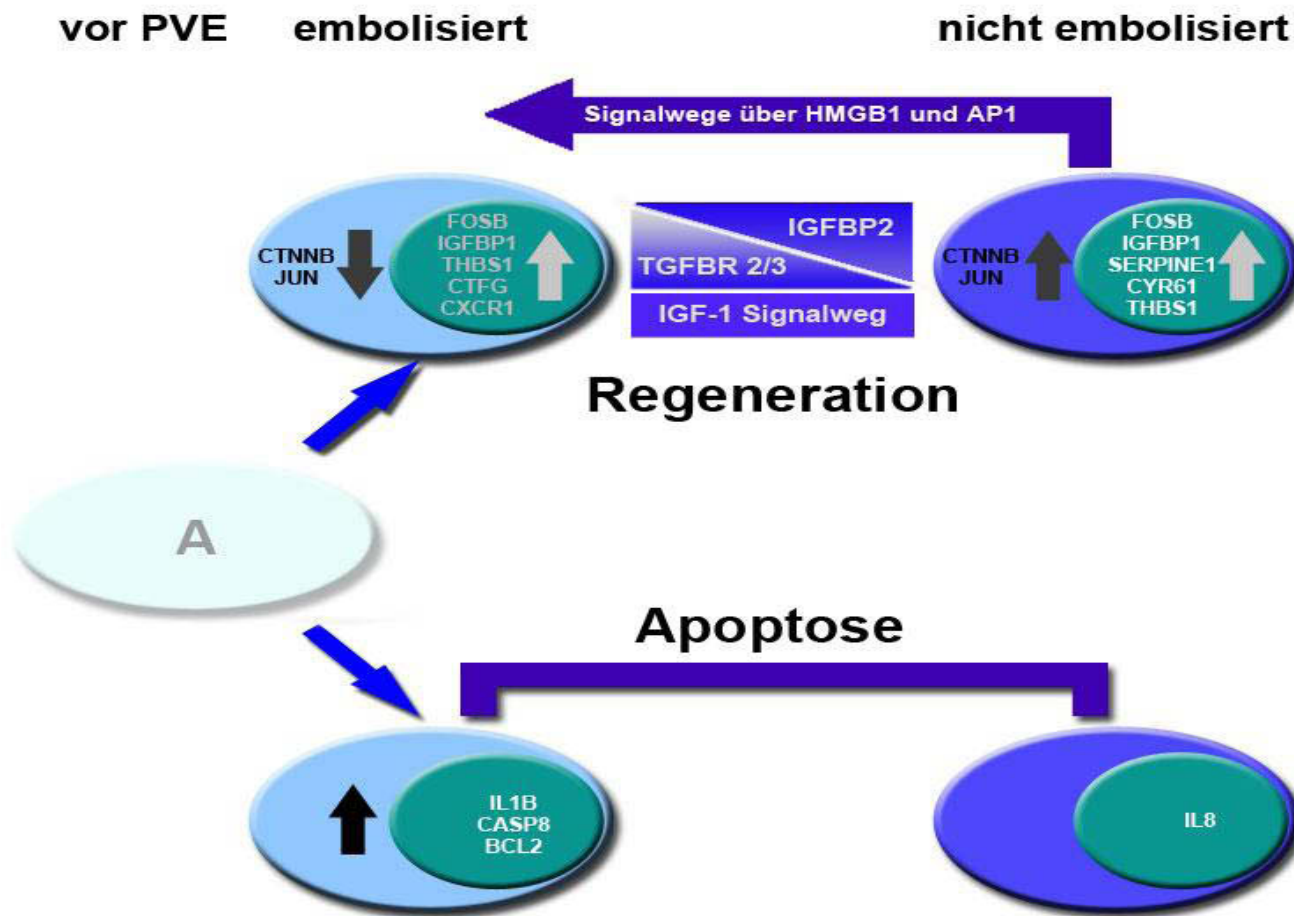


Abb. 17: Signalwege nach Pfortaderembolisation: A – Ausgangszustand, in Abhängigkeit von einer erfolgten Embolisation oder der zusätzlichen Blutzufuhr im nicht embolisierten Leberlappen werden von den Hepatozyten unterschiedliche Signalwege im Rahmen einer Apoptose oder einer Regeneration beschritten

7.2.4 Die Veränderungen der metabolischen Mechanismen nach Pfortaderembolisation

7.2.4.1 Unterschiede im Expressionsmuster von Enolase 3

Die Enolase ist ein glykolytisches Enzym, das im Zytosol der Zelle Glukose metabolisiert. Das Enzym ist in den Embden-Meyerhof-Parnas-Signalweg, welcher die Glykolyse beschreibt, eingebunden, indem es D-2-Phosphoglyzerat in Phosphoenolpyruvat dehydratisiert. Dieser Prozess dient der ATP- und somit der Energiegewinnung (Seweryn et al. 2008).

In einigen Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass eine direkte Korrelation zwischen dem Anstieg der Enolaseaktivität und der Progression von neuroendothelialen Tumoren, Neuroblastomen und Lungenkrebs existiert (Eriksson et al. 2000), die sich jedoch nicht allein auf eine Steigerung der Glykolyse zurückführen lassen (Chai et al. 2004).

Es wird daher angenommen, dass das Protein als multifunktionales Enzym fungiert, da es nicht nur eine glykolytische Funktion besitzt, sondern auch als Plasminogen-Rezeptor dient (Pancholi 2001).

Mit Hilfe der Real-Time-quantitative-PCR konnte ein signifikanter Unterschied in der Expression von ENO3 im embolisierten im direkten Vergleich zum nicht embolisierten Leberlappen festgestellt werden. Dieses Ergebnis erscheint vor dem Hintergrund eines erhöhten Energiebedarfes sinnvoll, da die Enolase ein Enzym ist, welches im Rahmen der Glykolyse zur Energiegewinnung beiträgt. Für die Hypertrophie des linken Leberlappens ist es daher sinnvoll, dass die Expression des Enzyms im Vergleich zum rechten Leberlappen gesteigert ist.

7.2.4.2 Veränderungen der Expression von dem Elektronen-Transfer-Flavoprotein

Das Elektronen-Transfer-Flavoprotein ist ein mitochondriales Matrix-Heterodimer bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit und enthält weiterhin ein Flavin-Adenin-Dinukleotid und ein Adenosinmonophosphat in jedem Heterodimer (Schiff et al. 2006).

Es ist sowohl an der β -Oxidation als auch an dem Transport von Elektronen in der Atmungskette beteiligt.

Liegt ein genetischer Defekt des Elektron-Transfer-Flavoproteins A, B oder der Elektron-Transfer-Flavoprotein-Dehydrogenase vor, entsteht klinisch das Bild einer Glutarazidurie Typ II (GA II).

Biochemisch kommt es hierbei zu einem multiplen Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel und einer erhöhten Menge an Acyl-Carnitinen unterschiedlicher Länge. Durch diese

Stoffwechselstörung wird die mitochondriale Fettsäureoxidation stark beeinträchtigt, es resultiert eine Akkumulation von kurz-, mittel- und langkettigen Fettsäuren. Sekundär zeigt sich außerdem eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Energiegewinnung im Rahmen der Atmungskette aufgrund der fehlerhaften Funktion der Elektronen-Transfer-Flavoprotein-Dehydrogenase. Letztere ist von der Acyl-CoA-Dehydrogenase der Fettsäureoxidation abhängig (Löffler and Petrides 1997).

Anhand dieser Krankheit kann die Funktion des Elektronen-Transfer-Flavoproteins gut veranschaulicht werden. Das Protein besitzt eine wichtige Funktion in der β -Oxidation, d.h. es dient der Energiegewinnung. Diese Tatsache kann gut anhand der Ergebnisse der RTq-PCR verdeutlicht werden. Es besteht sowohl ein signifikanter Unterschied in der Expression von ETFB im Leberlappen vor Embolisation und dem embolisierten Leberlappen als auch zwischen dem embolisierten und nicht embolisierten Leberlappen. Dieser Unterschied der Expression scheint sinnvoll, da vor allem im nicht embolisierten Leberlappen eine erhöhte Energiegewinnung von Vorteil zu sein scheint, um die Hypertrophie dieses Lappens zu gewährleisten. Eine Reduktion der Expression des Proteins im embolisierten Leberlappen erscheint im Rahmen der gesteigerten Apoptoserate der Hepatozyten sinnvoll und ist in diesem Zusammenhang mit einem reduzierten Energiebedarf vereinbar.

7.2.4.3 Unterschiede des Expressionsmusters von der Hydroxy-Coenzyme A Dehydrogenase

Die mitochondriale Fettsäuren-beta-Oxidation ist ein wichtiger Bestandteil der physiologischen Antwort auf Nahrungskarenz oder erhöhte muskuläre Aktivität. Das Ergebnis der beta-Oxidation ist das Acetyl-CoA, welches dann wiederum in der Atmungskette der Mitochondrien zur Energiegewinnung genutzt werden kann.

Die Hydroxyacyl-Coenzyme A Dehydrogenase (HADH) ist ein intramitochondriales Enzym, welches den vorletzten Schritt in der beta-Oxidation katalysiert (James et al. 2009).

Eine Mutation des HADH-Gens ist bei dem kongenitalen Hyperinsulinismus bekannt. Jedoch ist die genaue Funktion des HADH dabei nicht bekannt. Es konnte eine starke Expression des Enzyms in den beta-Zellen des Pankreas nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass eine erniedrigte Expression des HADH eine erhöhte Ausschüttung des Insulin verursacht. Somit scheint HADH den Körper vor inadäquater Insulinausschüttung und Hypoglykämien zu schützen (Hardy et al. 2007).

In einer weiteren Studie konnte eine direkte Korrelation der erhöhten Expression von HADH und dem Abfall des Fettsäurenspiegels im Plasma nachgewiesen werden. (Bouwman et al. 2009). Das wiederum erscheint sehr sinnvoll, da HADH einen wichtigen Bestandteil der beta-

Oxidation bildet. Zudem konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass körperliches Training die Expression von HADH in den Myozyten erhöht und somit die beta-Oxidation gesteigert werden kann (Stuewe et al. 2000).

Das Protein besitzt eine zentrale Funktion in der beta-Oxidation und dient somit der Energiegewinnung. Diese Tatsache lässt sich gut mit den Ergebnissen der RTq-PCR vereinbaren, denn es besteht sowohl ein signifikanter Unterschied zwischen dem Leberlappen vor Embolisation und dem embolisierten Lappen als auch zwischen dem embolisierten und nicht embolisierten Lappen. Um die Hypertrophie des Leberlappens zu gewährleisten, muss Energie bereitgestellt werden. Diese Energie wird unter anderem mithilfe der beta-Oxidation generiert. Der atrophisierte Leberlappen im Gegensatz braucht kaum Energie, deshalb scheint es sinnvoll, die Expression von Proteinen und somit auch die Expression des HADH einzustellen.

Es ist ein ähnlicher Unterschied der Expression beim Elektronen-Transfer-Flavoproteins zu erkennen. Dieser Zusammenhang scheint ebenfalls sinnvoll, da beide Enzyme einen Teil der beta-Oxidation katalysieren und somit synergistisch wirken.

7.2.5 Immunmodulatorische Prozesse nach Pfortaderembolisation

7.2.5.1 Immunmodulatorische Prozesse des Interleukin 1beta

Das Interleukin 1-beta ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches zur Akut-Phase-Reaktion führen kann.

Es spielt sowohl eine entscheidende Rolle in der Leberregeneration als auch in der Apoptose von Leberzellen. In der Arbeit von Cosgrove et al. konnte die Vielzahl der Funktionen von IL1-b aufgezeigt werden.

Das Interleukin kann über den Weg von c-jun, über Mechanismen, die noch Gegenstand aktueller Forschung sind, sowohl zur Proliferation als auch zur Apoptose des Hepatozyten führen. Weiterhin greift es regulierend in den Signalweg des IKK-NF-(Kappa), welcher die Apoptose inhibiert und die Proliferation der Zelle aktiviert, ein. Zudem reguliert IL1b den Signalweg des p38, welcher wiederum zur Apoptose des Hepatozyten führt (Cosgrove et al. 2008)

Es konnte nachgewiesen werden, dass IL-1b die Synthese von NO in den Zellen der Gefäße stimuliert und somit einen wichtigen Beitrag zum Gefäßtonus leistet (Marczin et al. 1993).

Außerdem wird diskutiert, dass das Interleukin den hepatozellulären Wachstumsfaktor (HGF) stimuliert und somit eine Proliferation der Hepatozyten begünstigt wird (Nagai et al. 2004).

In der vorliegenden Studie konnte mittels der RTq-PCR ein signifikanter Unterschied zwischen der Expression von IL-1b im embolisierten und im nicht embolisierten Leberlappen

festgestellt werden. Im nicht embolisierten Leberlappen ist die Expression des IL-1b im Vergleich sowohl zum embolisierten als auch zum Ausgangszustand vor Embolisation deutlich erhöht. Dieses Ergebnis lässt sich gut mit den Forschungsergebnissen aus anderen Arbeiten vereinbaren (Cosgrove et al. 2008). IL-1b kann positiv in die Regulation der Zellproliferation eingreifen, indem es verschiedene Signalwege aktiviert. Eine erhöhte Expression im nicht embolisierten Leberlappen scheint im Rahmen der Hypertrophie des linken Leberlappens in diesem Kontext sinnvoll zu sein.

Weiterhin lässt sich auch eine Expressionssteigerung des IL-1b im embolisierten Leberlappen im Vergleich zum Leberlappen vor Embolisation aufzeigen. Dieses Ergebnis ist jedoch nur als Tendenz zu verstehen, da das geforderte Signifikanzniveau nicht erfüllt ist. Auch dieses Ergebnis lässt sich anhand der Funktion des IL-1b erklären, denn IL-1b weist neben proliferativen auch apoptotische Funktionen auf. Weiterhin unterstützt es die Synthese des NO, welches für eine Gefäßdilatation sorgt. Dieser Vorgang ist regulatorisch im embolisierten Lappen zu erwarten, um die durch die Embolisation erreichte Einschränkung der Gewebepfusion zu kompensieren.

7.2.5.2 Expressionsunterschied des Proteasome activator subunit 2

Der Großteil proteolytischen Prozesse in Zytoplasma und Zellkern ist an die Funktion von Proteasomen gekoppelt. Die Proteolyse besitzt eine wichtige Funktion in der Regulation und der Homöostase der Zelle (Ciechanover et al. 2000).

Weiterhin sind Proteasomen in den Prozess des Zellzyklus, die Regulation der Transkription und in die Antigenprozessierung involviert (Hochstrasser 1995).

Die Proteasome activator subunit 2 (PA28 beta / PSME2) ist ein Aktivator der Peptidase-Aktivität der Proteasomen und reguliert die Funktion des Proteasoms, indem es den Eintritt von zu spaltenden Proteinen in den Proteasomkomplex begünstigt. Des Weiteren ist PSME2 an der Entstehung von MHC1-Molekülen beteiligt (Kuehn und Dahlmann 1997). In einigen Studien konnte nachgewiesen werden, dass PSME2 eine regulierende Funktion besitzt, da ein isolierter Anstieg des PA28 zu einer verbesserten Antigenpräsentation seitens der Zelle für immunkompetente Zellen führt (Groettrup et al. 1996).

Zellen, die maligne entartet oder von Viren befallen sind, präsentieren über das MHC1 ihr ca. neun Aminosäuren langes Antigen den NK-Zellen, welche nachfolgend an diesen Rezeptor binden können. Durch eine aufwendige Zytokin-Kaskade kann hierauf die Apoptose der Zelle eingeleitet werden (Rechsteiner und Hill 2005).

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass Interferon- γ einen positiven Einfluss auf die Expression von PSME2 besitzt (Sijts et al. 2002).

Die Tatsache, dass das PSME2 an der Prozessierung der MHC1-Moleküle beteiligt ist und somit eine bessere Immunpräsentation der Zelle gewährleistet wird, lässt sich gut mit der erhöhten Expression des PSME2 im Leberlappen vor Embolisation vereinbaren. Die Biopsie wurde aus dem Leberlappen entnommen, in dem sich auch der Tumor des Patienten befand. Es wurde zwar darauf geachtet, dass die Probe aus einem tumorfreien Gebiet der Leber entnommen wurde, dennoch könnten auch Zellen aus der Umgebung des Tumors bereits infiltriert und somit eine verstärkte Präsentation der Tumorantigene an der Zelloberfläche realisiert worden sein. Zudem könnten die maligne entarteten Zellen eine erhöhte Expression von Interferon- γ aufweisen, welches wiederum mit einer erhöhten Expression von PSME2 einhergehen würde.

Dies würde bedeuten, dass eine erhöhte Antigenpräsentation an der Zelloberfläche dieser Zellen stattfindet. Für die Präsentation werden vermehrt MHC1-Moleküle benötigt, die wiederum durch PSME2 prozessiert werden müssen. Aufgrund dieser Hypothesen lässt sich eine erhöhte Expression des PSME2 in der Biopsie vor der Embolisation erklären.

Außerdem konnten in einigen Studien nachgewiesen werden, dass PSME2 nicht nur eine Funktion in der Immunantwort zu besitzen scheint, sondern auch im Abbau und der Reparatur von Proteinen beteiligt ist (Tanahashi et al. 2000) (Minami et al. 2000).

Es konnte eine signifikant erhöhte Expression des PSME2 im nicht embolisierten Leberlappen im Vergleich zum embolisierten Leberlappen festgestellt werden. Dies scheint sinnvoll für die Hypertrophie des linken Leberlappens zu sein, denn um eine Hypertrophie eines Gewebes gewährleisten zu können, muss ein erhöhter Proteinumsatz stattfinden.

7.2.6 Veränderungen in den Zellkompartimenten im Rahmen der Leberregeneration

7.2.6.1 Rolle des Activator of heat shock 2 im Rahmen der Leberregeneration

Das Heat Shock Protein 90, ein molekulares Chaperon, ist für eine korrekte Faltung und Stabilität vor allem von Proteinen verantwortlich, die für das Wachstum und die Aufrechterhaltung von Tumorzellen wichtig sind (Workman et al. 2007) (Martinez-Yamout et al. 2006).

AHSA2 besitzt eine wichtige Funktion als Cochaperon in dem Hsp90/Hsp70 Chaperon-Komplex. Es bindet an eine spezifische Region des Hsp90, um die Aktivität des Chaperons zu verbessern, indem es die ATPase-Aktivität, die Interaktion zwischen Hsp90 und Hsp70 und die Proteinbindung bzw. Proteinablösung reguliert (Caplan 2003). Damit lässt sich

verallgemeinern, dass AHSA2 eine Rolle als Aktivator des Chaperons Hsp90 einnimmt, indem es die ATPase-Aktivität steigert (Ran et al. 2010).

Dies lässt sich gut mit den Ergebnissen der RTq-PCR vereinbaren. Es konnte ein signifikanter Unterschied in der Genexpression von AHSA2 zwischen dem embolisierten Leberlappen und dem nicht embolisierten Leberlappen beschrieben werden. Das Cochaperon zeigt eine erhöhte Expression im nicht embolisierten Leberlappen. Vergleicht man dies nun mit der oben genannten Studienlage, so scheint dieser Unterschied vor dem Hintergrund einer Hypertrophie des nicht embolisierten Leberlappens sinnvoll. Das Cochaperon AHSA2 besitzt eine positive Regulatorfunktion, indem es hilft, neu synthetisierte Proteine richtig zu falten. Um eine Hypertrophie des Leberlappens gewährleisten zu können, muss eine erhöhte Neusynthese von Proteinen stattfinden und einer Faltung durch Chaperone zugeführt werden. Dies wird durch eine erhöhte Expression des Cochaperons in dem nicht embolisierten Leberlappen begünstigt.

7.2.6.2 Expressionsunterschied der ATPase, H⁺ transporting V0 subunit e2

Die ATPase, H⁺ transporting V0 subunit e2 (ATP6V0E2) ist überlebenswichtig, weil sie für die Ansäuerung verschiedener eukaryoter Zellkompartimente wie z.B. Vakuolen, Vesikel, Endosomen und Lysosomen von entscheidender Bedeutung ist. Diese Ansäuerung des Kompartiments dient sowohl dem intrazellulären Membran-Transport, der Prohormon- als auch der Neurotransmitter-Bildung (Nishi und Forgac 2002).

Die Funktion des Proteins besteht darin, in Abhängigkeit von ATP Protonen aus dem Zytoplasma zu pumpen, entweder in den Extrazellularraum oder in ein intrazelluläres Lumen (Blake-Palmer et al. 2007).

Weiterhin wird die Assoziation der Untereinheit V der ATPase mit anderen zellulären Proteinen vermutet. So konnte z.B. bei der 16-kDa Proteolipid-C-Untereinheit der V0-Domäne eine Verknüpfung mit dem E5-Onkoproteins des platelet derived growth factor (PDGF) gefunden werden. Diese Assoziation lässt vermuten, dass die Untereinheit der ATPase mitunter für Zellwachstum und Transformation zuständig ist (Skinner und Wildeman 1999).

Diese Aussage würde sich wiederum gut mit dem signifikanten Unterschied zwischen dem embolisierten und dem nicht embolisierten Leberlappen der Daten der RTq-PCR vereinbaren lassen. Wenn die V0 Untereinheit der ATPase mit Wachstum und Transformation assoziiert ist, scheint es sinnvoll, dass gerade dieses Protein im nicht embolisierten Leberlappen signifikant höher exprimiert ist als im emboliserten Lappen.

Zudem wird diskutiert, dass das Protein in malignen Tumoren höher exprimiert wird als in gesundem Gewebe. Denn durch die Ansäuerung kann die extrazelluläre Matrix zerstört werden, welches ein wichtiger Bestandteil der Metastasierung ist (Stevens und Forgac 1997). Diese Tatsache könnte die hohe Expression des Proteins in dem Leberlappen vor Embolisation erklären.

8 Schlussfolgerung

Bisher wurden viele Studien zum Verfahren der PAE sowie dessen Folgen für den Organismus auf Ebene molekularer Mechanismen an Tiermodellen durchgeführt. Es liegen jedoch keine Daten über diese Vorgänge beim Menschen vor.

In der vorliegenden Arbeit wurden humane Zielgene mithilfe der Bead Array-Technologie ausgewählt und anhand von zehn Patientenproben das Genexpressionsmuster mittels Real-Time-quantitative-PCR ermittelt und durch immunhistochemische Untersuchungen des Lebergewebes ergänzt.

Sowohl in der RTq-PCR als auch in Immunfluoreszenz-Messungen zeigten sich deutliche Unterschiede in den Expressionsmustern der Proben vor der Embolisation, aus dem embolisierten Lappen und aus dem nicht embolisierten Leberlappen. Die Proteine vermitteln in verschiedenen Zellkompartimenten durch unterschiedliche Funktionen und Stoffwechselprozesse die Regeneration, Proliferation und Hypertrophie des Lebergewebes.

Anhand der Ergebnisse konnten wir ein Modell über den Zusammenhang der molekularen Vorgänge sowohl während der Proliferation als auch bei der Apoptose erstellen.

Dieses Modell zeigt eine zentrale Funktion des IGF-Signalweges auf, welcher einen wichtigen Einfluss auf die Regulation von Zellwachstum und Proliferation durch die Aktivierung der Transkription von Genen, die für die Kontrolle und den Ablauf des Zellzyklus von großer Bedeutung sind, hat.

Weiterhin konnten wir die wichtige Funktion der Proteinen c-jun und beta-catenin im Regenerationsprozess der Leber beschreiben. Selbst 40 Tage nach erfolgter Embolisation zeigten sie ein deutlich erhöhtes Expressionsniveau im nicht embolisierten im Vergleich zum embolisierten Leberlappen.

In unserem Modell konnten wir Unterschiede der Glykoproteine THBS1 und ENO3 finden, welche Interaktionen zwischen den Zellen untereinander und zwischen Zellen und interstitieller Matrix kontrollieren. Zudem nehmen die Gene, IL1b, BCL2 und CASP8 eine wichtige Rolle im Rahmen der Apoptose ein.

Mithilfe dieser Erkenntnis können nun weitergehende Forschungen auf diesem Gebiet angestrebt werden. Vor allem Proteine, die eine wichtige Funktion in der Apoptose einnehmen, sollten noch präziser untersucht werden.

Im nächsten Schritt wäre es mitunter erforderlich, eine potentiell pharmakologische Stimulation dieser Gene zu finden, welche eine wichtige Funktion in der Leberregeneration übernehmen. Der Einsatz solcher Medikamente könnte zu einer gesteigerten

Regenerationsbereitschaft der Leber führen und somit das funktionelle Lebervolumen erhöhen.

Daraus resultiert, dass die Komplikationen des postoperativen Leberversagens weiter gesenkt werden könnten.

Insgesamt kann diese Arbeit zwar immer noch nicht alle Fragen nach allen molekularen Vorgängen der Leberregeneration beantworten, dennoch konnten neue Erkenntnisse über die pathophysiologischen Mechanismen der PAE erlangt werden, welche der weiterführenden Forschung über dieses Thema helfen sollen.

9 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abulkhir A, Limongelli P, Healey AJ, Damrah O, Tait P, Jackson J, Habib N, Jiao LR. 2008. Preoperative portal vein embolization for major liver resection: a meta-analysis. *Ann Surg*, 247 (1):49-57.
- Azoulay D, Castaing D, Krissat J, Smail A, Hargreaves GM, Lemoine A, Emile JF, Bismuth H. 2000. Percutaneous portal vein embolization increases the feasibility and safety of major liver resection for hepatocellular carcinoma in injured liver. *Ann Surg*, 232 (5):665-672.
- Bax HR, Mansens BJ, Schalm L. 1956. Atrophy of the liver after occlusion of the bile ducts or portal vein and compensatory hypertrophy of the unoccluded portion and its clinical importance. *Gastroenterology*, 31 (2):131-155.
- Bechstein WO, Golling M. 2005. [Standard surgical resection of colorectal liver metastases]. *Chirurg*, 76 (6):543-551.
- Binetruy B, Heasley L, Bost F, Caron L, Aouadi M. 2007. Concise review: regulation of embryonic stem cell lineage commitment by mitogen-activated protein kinases. *Stem Cells*, 25 (5):1090-1095.
- Bismuth H NR, Diamond T. 1992. Management strategies in resection for hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg*, 215:31-38.
- Blake-Palmer KG, Su Y, Smith AN, Karet FE. 2007. Molecular cloning and characterization of a novel form of the human vacuolar H⁺-ATPase e-subunit: an essential proton pump component. *Gene*, 393 (1-2):94-100.
- Bosch F, Ribes, J. 2005. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis*, 9:191-211.
- Bouwman FG, Claessens M, van Baak MA, Noben JP, Wang P, Saris WH, Mariman EC. 2009. The physiologic effects of caloric restriction are reflected in the in vivo adipocyte-enriched proteome of overweight/obese subjects. *J Proteome Res*, 8 (12):5532-5540.
- Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC, Gaasterland T, Glenisson P, Holstege FC, Kim IF, Markowitz V, Matese JC, Parkinson H, Robinson A, Sarkans U, Schulze-Kremer S, Stewart J, Taylor R, Vilo J, Vingron M. 2001. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet*, 29 (4):365-371.
- Brenner DA. 1998. Signal transduction during liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol*, 13 Suppl:S93-95.
- Caplan AJ. 2003. What Is a Co-Chaperone? *Cell Stress & Chaperones*, 8 (2):105-107.
- Castaing D, Azoulay, D. 2007. *Leberchirurgie und Chirurgie der portalen Hypertension*. Urban & Fischer.
- Chai G, Brewer JM, Lovelace LL, Aoki T, Minor W, Lebiada L. 2004. Expression, purification and the 1.8 angstroms resolution crystal structure of human neuron specific enolase. *J Mol Biol*, 341 (4):1015-1021.
- Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL. 2000. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays*, 22 (5):442-451.
- Cosgrove BD, Cheng C, Pritchard JR, Stolz DB, Lauffenburger DA, Griffith LG. 2008. An inducible autocrine cascade regulates rat hepatocyte proliferation and apoptosis responses to tumor necrosis factor- α . *Hepatology*, 48 (1):276-288.
- Covey AM, Tuorto S, Brody LA, Sofocleous CT, Schubert J, von Tengg-Kobligk H, Getrajdman GI, Schwartz LH, Fong Y, Brown KT. 2005. Safety and efficacy of preoperative portal vein embolization with polyvinyl alcohol in 58 patients with liver metastases. *AJR Am J Roentgenol*, 185 (6):1620-1626.

- de Baere T, Roche A, Vavasseur D, Therasse E, Indushekar S, Elias D, Bognel C. 1993. Portal vein embolization: utility for inducing left hepatic lobe hypertrophy before surgery. *Radiology*, 188 (1):73-77.
- Di Stefano DR, de Baere T, Denys A, Hakime A, Gorin G, Gillet M, Saric J, Trillaud H, Petit P, Bartoli JM, Elias D, Delpero JR. 2005. Preoperative percutaneous portal vein embolization: evaluation of adverse events in 188 patients. *Radiology*, 234 (2):625-630.
- Eferl R, Ricci R, Kenner L, Zenz R, David JP, Rath M, Wagner EF. 2003. Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell*, 112 (2):181-192.
- Elias D, De Baere T, Roche A, Mducreux, Leclere J, Lasser P. 1999. During liver regeneration following right portal embolization the growth rate of liver metastases is more rapid than that of the liver parenchyma. *Br J Surg*, 86 (6):784-788.
- Elmlinger MW, Mayer I, Schnabel D, Schuett BS, Diesing D, Romalo G, Wollmann HA, Weidemann W, Spindler KD, Ranke MB, Schweikert HU. 2001. Decreased expression of IGF-II and its binding protein, IGF-binding protein-2, in genital skin fibroblasts of patients with complete androgen insensitivity syndrome compared with normally virilized males. *J Clin Endocrinol Metab*, 86 (10):4741-4746.
- Eriksson B, Oberg K, Stridsberg M. 2000. Tumor markers in neuroendocrine tumors. *Digestion*, 62 Suppl 1:33-38.
- Ferrero A, Vigano L, Polastri R, Muratore A, Eminefendic H, Regge D, Capussotti L. 2007. Postoperative liver dysfunction and future remnant liver: where is the limit? Results of a prospective study. *World J Surg*, 31 (8):1643-1651.
- Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. 1999. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg*, 230 (3):309-318; discussion 318-321.
- Groettrup M, Soza A, Eggers M, Kuehn L, Dick TP, Schild H, Rammensee HG, Koszinowski UH, Kloetzel PM. 1996. A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. *Nature*, 381 (6578):166-168.
- Hardy OT, Hohmeier HE, Becker TC, Manduchi E, Doliba NM, Gupta RK, White P, Stoeckert CJ, Jr., Matschinsky FM, Newgard CB, Kaestner KH. 2007. Functional genomics of the beta-cell: short-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase regulates insulin secretion independent of K⁺ currents. *Mol Endocrinol*, 21 (3):765-773.
- Hatton JP, Pooran M, Li CF, Luzzio C, Hughes-Fulford M. 2003. A short pulse of mechanical force induces gene expression and growth in MC3T3-E1 osteoblasts via an ERK 1/2 pathway. *J Bone Miner Res*, 18 (1):58-66.
- Herold. 2008. *Innere Medizin*.
- Hochstrasser M. 1995. Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr Opin Cell Biol*, 7 (2):215-223.
- Honjo I, Suzuki T, Ozawa K, Takasan H, Kitamura O. 1975. Ligation of a branch of the portal vein for carcinoma of the liver. *Am J Surg*, 130 (3):296-302.
- Hu Z, Lee IH, Wang X, Sheng H, Zhang L, Du J, Mitch WE. 2007. PTEN expression contributes to the regulation of muscle protein degradation in diabetes. *Diabetes*, 56 (10):2449-2456.
- Itoh H, Yagi M, Fushida S, Tani T, Hashimoto T, Shimizu K, Miwa K. 2000. Activation of immediate early gene, c-fos, and c-jun in the rat small intestine after ischemia/reperfusion. *Transplantation*, 69 (4):598-604.
- James C, Kapoor RR, Ismail D, Hussain K. 2009. The genetic basis of congenital hyperinsulinism. *J Med Genet*, 46 (5):289-299.

- Kakizawa H, Toyota N, Arihiro K, Naito A, Fujimura Y, Hieda M, Hirai N, Tachikake T, Matsuura N, Murakami Y, Itamoto T, Ito K. 2006. Preoperative portal vein embolization with a mixture of gelatin sponge and iodized oil: efficacy and safety. *Acta Radiol*, 47 (10):1022-1028.
- Kinoshita H, Sakai K, Hirohashi K, Igawa S, Yamasaki O, Kubo S. 1986. Preoperative portal vein embolization for hepatocellular carcinoma. *World J Surg*, 10 (5):803-808.
- Kollet O, Shvitiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA, Lapidot T. 2003. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest*, 112 (2):160-169.
- Kuehn L, Dahlmann B. 1997. Structural and functional properties of proteasome activator PA28. *Mol Biol Rep*, 24 (1-2):89-93.
- Laufer WW. 1985. Mechanism and role of intrinsic regulation of hepatic arterial blood flow: hepatic arterial buffer response. *Am J Physiol*, 249 (5 Pt 1):G549-556.
- Lee DY, Kim SJ, Lee YC. 1999. Serum insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding proteins in lung cancer patients. *J Korean Med Sci*, 14 (4):401-404.
- Madoff DC, Abdalla EK, Vauthey JN. 2005. Portal vein embolization in preparation for major hepatic resection: evolution of a new standard of care. *J Vasc Interv Radiol*, 16 (6):779-790.
- Madoff DC, Hicks ME, Abdalla EK, Morris JS, Vauthey JN. 2003. Portal vein embolization with polyvinyl alcohol particles and coils in preparation for major liver resection for hepatobiliary malignancy: safety and effectiveness--study in 26 patients. *Radiology*, 227 (1):251-260.
- Makuuchi M, Kosuge T, Lygidakis NJ. 1991. New possibilities for major liver surgery in patients with Klatskin tumors or primary hepatocellular carcinoma--an old problem revisited. *Hepatogastroenterology*, 38 (4):329-336.
- Makuuchi M, Thai BL, Takayasu K, Takayama T, Kosuge T, Gunven P, Yamazaki S, Hasegawa H, Ozaki H. 1990. Preoperative portal embolization to increase safety of major hepatectomy for hilar bile duct carcinoma: a preliminary report. *Surgery*, 107 (5):521-527.
- Marczin N, Papapetropoulos A, Catravas JD. 1993. Tyrosine kinase inhibitors suppress endotoxin- and IL-1 beta-induced NO synthesis in aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 265 (3 Pt 2):H1014-1018.
- Martinez-Yamout MA, Venkitakrishnan RP, Preece NE, Kroon G, Wright PE, Dyson HJ. 2006. Localization of sites of interaction between p23 and Hsp90 in solution. *J Biol Chem*, 281 (20):14457-14464.
- Minami Y, Kawasaki H, Minami M, Tanahashi N, Tanaka K, Yahara I. 2000. A critical role for the proteasome activator PA28 in the Hsp90-dependent protein refolding. *J Biol Chem*, 275 (12):9055-9061.
- Monga SP, Padiaditakis P, Mule K, Stolz DB, Michalopoulos GK. 2001. Changes in WNT/beta-catenin pathway during regulated growth in rat liver regeneration. *Hepatology*, 33 (5):1098-1109.
- Nagai K, Aoe M, Shimizu N. 2004. Rapid response of hepatocyte growth factor in pulmonary ischemia in a rat model. *Acta Med Okayama*, 58 (3):119-125.
- Neuhaus P, Jonas S, Settmacher U, Thelen A, Benckert C, Lopez-Hanninen E, Hintze RE. 2003. Surgical management of proximal bile duct cancer: extended right lobe resection increases resectability and radicality. *Langenbecks Arch Surg*, 388 (3):194-200.
- Nishi T, Forgacs M. 2002. The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3 (2):94-103.

- Nguyen BP, Gil SG, Carter WG. 2000. Deposition of laminin 5 by keratinocytes regulates integrin adhesion and signaling. *J Biol Chem*, 275 (41):31896-31907.
- Olazabal IM, Munoz JA, Rodriguez-Navas C, Alvarez L, Delgado-Baeza E, Garcia-Ruiz JP. 2009. Prolactin's role in the early stages of liver regeneration in rats. *J Cell Physiol*, 219 (3):626-633.
- Pancholi V. 2001. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci*, 58 (7):902-920.
- Renz-Polster H Ks, Braun J. 2008. *Basislehrbuch Innere Medizin*. URBAN & FISCHER München.
- Ran F, Gadura N, Michels CA. 2010. The Hsp90 cochaperone Aha1 is a negative regulator of the *Saccharomyces* MAL-activator and acts early in the chaperone activation pathway. *J Biol Chem*.
- Ranke MB, Maier KP, Schweizer R, Stadler B, Schleicher S, Elmlinger MW, Flehmig B. 2003. Pilot study of elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 as indicators of hepatocellular carcinoma. *Horm Res*, 60 (4):174-180.
- Rechsteiner M, Hill CP. 2005. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol*, 15 (1):27-33.
- Rocheleau B, Ethier C, Houle R, Huet PM, Bilodeau M. 1999. Hepatic artery buffer response following left portal vein ligation: its role in liver tissue homeostasis. *Am J Physiol*, 277 (5 Pt 1):G1000-1007.
- Rous P, Larimore, L. 1920. Relation of the portal blood to liver main-tenance: a demonstration of liver atrophy conditional on compensation. *Exp Med*, 31:609-632.
- Schiff M, Froissart R, Olsen RK, Acquaviva C, Vianey-Saban C. 2006. Electron transfer flavoprotein deficiency: functional and molecular aspects. *Mol Genet Metab*, 88 (2):153-158.
- Seweryn E, Bednarz-Misa IS, Danielewicz R, Saczko J, Kulbacka J, Dawiskiba T, Pietkiewicz J. 2008. Distribution of beta-enolase in normal and tumor rat cells. *Folia Histochem Cytobiol*, 46 (4):519-524.
- Shaulian E, Karin M. 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, 20 (19):2390-2400.
- Shimasaki S, Ling N. 1991. Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 and -6). *Prog Growth Factor Res*, 3 (4):243-266.
- Sijts A, Sun Y, Janek K, Kral S, Paschen A, Schadendorf D, Kloetzel PM. 2002. The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing. *Mol Immunol*, 39 (3-4):165-169.
- Simmen FA, Badinga L, Green ML, Kwak I, Song S, Simmen RC. 1998. The porcine insulin-like growth factor system: at the interface of nutrition, growth and reproduction. *J Nutr*, 128 (2 Suppl):315S-320S.
- Skinner MA, Wildeman AG. 1999. beta(1) integrin binds the 16-kDa subunit of vacuolar H(+)-ATPase at a site important for human papillomavirus E5 and platelet-derived growth factor signaling. *J Biol Chem*, 274 (33):23119-23127.
- Song TJ, Adusumilli P, Fong Y. 2005. [Prognostic factors in the evaluation of colorectal liver metastases]. *Chirurg*, 76 (6):535-536, 538-542.
- Stepniak E, Ricci R, Eferl R, Sumara G, Sumara I, Rath M, Hui L, Wagner EF. 2006. c-Jun/AP-1 controls liver regeneration by repressing p53/p21 and p38 MAPK activity. *Genes Dev*, 20 (16):2306-2314.
- Stevens TH, Forgac M. 1997. Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13:779-808.

- Stuewe SR, Gwartz PA, Agarwal N, Mallet RT. 2000. Exercise training enhances glycolytic and oxidative enzymes in canine ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 32 (6):903-913.
- Tang X, Powelka AM, Soriano NA, Czech MP, Guilherme A. 2005. PTEN, but not SHIP2, suppresses insulin signaling through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 280 (23):22523-22529.
- Tarla MR, Ramalho FS, Ramalho LN, Silva Tde C, Brandao DF, Ferreira J, Silva Ode C, Zucoloto S. 2006. A molecular view of liver regeneration. *Acta Cir Bras*, 21 Suppl 1:58-62.
- Taub R. 2004. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5 (10):836-847.
- Thompson MD, Monga SP. 2007. WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology*, 45 (5):1298-1305.
- Tsuda M, Kurihara N, Saito H, Yamaki T, Shimamura H, Narushima Y, Ishiyama S, Sato A, Takahashi S. 2006. Ipsilateral percutaneous transhepatic portal vein embolization with gelatin sponge particles and coils in preparation for extended right hepatectomy for hilar cholangiocarcinoma. *J Vasc Interv Radiol*, 17 (6):989-994.
- Wheatcroft SB, Kearney MT. 2009. IGF-dependent and IGF-independent actions of IGF-binding protein-1 and -2: implications for metabolic homeostasis. *Trends Endocrinol Metab*, 20 (4):153-162.
- Workman P, Burrows F, Neckers L, Rosen N. 2007. Drugging the cancer chaperone HSP90: combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress. *Ann N Y Acad Sci*, 1113:202-216.
- Yokoyama Y, Nagino M, Nimura Y. 2007a. Mechanisms of hepatic regeneration following portal vein embolization and partial hepatectomy: a review. *World J Surg*, 31 (2):367-374.
- Yokoyama Y, Nagino M, Nimura Y. 2007b. Mechanism of impaired hepatic regeneration in cholestatic liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 14 (2):159-166.

10 Anhang

Patienten-Nummer	Alter	Diagnose	Weitere Diagnosen	Zeitintervall PAV-OP	Cholestase vor/nach PAV	Chemotherapie Vor PAV	Komplikationen	Operations-technik
1	69	Kolorektale Lebermetastasen	Nein	40	Nein/Nein	Nein	Nein	Rechte Trisektorektomie
2	69	Cholangiozelluläres-Karzinom	NIDDM	50	Nein/Nein	Nein	Nein	Rechte Trisektorektomie
3	68	Cholangiozelluläres-Karzinom	Arterielle Hypertonie	40	Nein/Nein	Nein	Nein	Rechte Trisektorektomie
4	78	Gallenblasen-Karzinom	Nein	39	Nein/Nein	Nein	Nein	Rechte Trisektorektomie
5	79	Cholangiozelluläres-Karzinom	Arterielle Hypertonie	39	Nein/Nein	Nein	Nein	Rechte Trisektorektomie
6	48	Gallenblasen-Karzinom	Nein	35	Nein/Nein	Nein	Nein	Rechte Trisektorektomie
7	46	Dysontogenetische Lebertumor	Nein	55	Nein/Nein	Nein	Nein	Rechte Trisektorektomie
8	49	Cholangiozelluläres-Karzinom	Nein	52	Ja/Nein	Nein	Biliom	Rechte Trisektorektomie
9	57	Gallenblasen-Karzinom	Nein	41	Nein/Ja	Nein	Nein	Explorative Laparotomie
10	68	Kolorektale Lebermetastasen	NIDDM	34	Nein/Nein	Nein	Nein	Explorative Laparotomie

Abb. 18: Darstellung der Patientendaten

Patienten-Nummer	TLV vor PAE	FRLV vor PAE	TLV nach PAE	FRLV nach PAE	FRLV nach PAE vs. FRLV vor PAE in %	Embolisations-Material
1	2154	539	1800	681	126,3	Histoacryl/Lipiodol
2	2177	748	2049	839	112,2	Histoacryl/Lipiodol
3	NA	NA	866	246	-	GDC/Histoacryl/Lipiodol
4	1758	316	1590	640	202,5	Amplatzer/Histoacryl/Lipiodol
5	NA	NA	1911	716	-	Histoacryl/Lipiodol
6	2363	323	2062	477	147,7	Histoacryl/Lipiodol
7	1635	279	2179	463	165,9	Histoacryl/Lipiodol
8	797	200	1800	500	250	GDC
9	1640	445	1936	417	93,7	Histoacryl/Lipiodol
10	1800	217	2219	290	133,6	Bead Block

Abb. 19: Darstellung des totale Lebervolumen (TLV) und das funktionelle Lebervolumen (FLRV) der Lebersegmente 2 und 3 vor und nach PAE

10.1 Lebenslauf

Persönliche Daten

<i>Name:</i>	Ullmann
<i>Vorname:</i>	Janina
<i>Geburtsdatum:</i>	16.07.1985
<i>Geburtsort:</i>	Aachen
<i>Familienstand:</i>	ledig, keine Kinder

Schulbildung

<i>1992-1996</i>	Grundschule Bad Essen
<i>1996-1998</i>	Orientierungsstufe Bad Essen
<i>1998-2005</i>	Gymnasium Bad Essen
<i>2002-2003</i>	Livonia, Churchill Highschool, Michigan USA
<i>Juni 2003</i>	Highschool Diploma
<i>Juni 2005</i>	Schulabschluss mit dem Abitur/ Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

<i>10/2005-08/2007</i>	Vorklinisches Studium an der FSU Jena
<i>09/2007</i>	Ärztliche Vorprüfung
<i>10/2007-07/2010</i>	Klinisches Studium an der FSU Jena
<i>08/2010</i>	Beginn des praktischen Jahres

10.2 Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. habil. Utz Settmacher für die Überlassung des Themas der Promotion und die Ermöglichung dieser Dissertation bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Falk Rauchfuß für die exzellente persönliche Betreuung, die freundliche Unterstützung bei der Bearbeitung des Promotionsthemas und die wertvollen Hinweise und Anregungen für den schriftlichen Teil der Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei PD Dr. rer. nat. med. habil. Ralf Alexander Claus, Markus Bläss, Brigitte Specht und Edith Walther für die stets freundliche und konstruktive Hilfe im Labor bedanken. Ganz besonders hilfreich war dabei die Erlaubnis, die Geräte, Arbeitsräume und Materialien der Forschungslabore der experimentellen Anästhesie nutzen zu dürfen.

Ebenso möchte ich mich ganz herzlich bei allen Freunden und Menschen bedanken, die mich bei dieser Arbeit begleitet haben. Mein besonderer Dank gilt Tobias Rachow, der mir immer wieder mit wertvollen Hinweisen zur Seite stand.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen lieben Eltern für die moralische Unterstützung, die unendliche Geduld und die Ermöglichung des Medizinstudiums bedanken.

10.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Herr Dr. med. Falk Rauchfuß,

Herr PD Dr. rer. nat. med. habil. Ralf Claus,

Herr Sandro Lambeck

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 26.07.2010

Janina Ullmann